

**MicroPatent® Family Lookup**

Stage 1 Patent Family - "Complex"		Priorities and Applications	
CC DocNum	KD PubDate	CC AppNum	KD AppDate
<input type="checkbox"/> AU 4035199	A1 19991123	AU 40351 DE 19819273 WO 9902892	A 19990429 A 19980430 W 19990429
<input type="checkbox"/> DE 19819273	A1 19991111	DE 19819273 DE 19819273	A 19980430 A 19980430
<input type="checkbox"/> EP 1073426	A1 20010207	DE 19819273 EP 99923490 WO 9902892	A 19980430 A 19990429 W 19990429
<input type="checkbox"/> WO 9956733	A1 19991111	DE 19819273 WO 9902892	A 19980430 A 19990429
4 Publications found.			
Add Selected Documents to Order		Display the Extended Patent Family	

**No English title available.**

Patent Number: DE19819273  
Publication date: 1999-11-11  
Inventor(s): RUNGE STEPHAN ANTON (DE); MUELLER RAINER (DE); RAVELLI VITTORINO (IT)  
Applicant(s): PHARMATEC INTERNATIONAL S GIUL (IT)  
Requested Patent: ☐ DE19819273  
Application Number: DE19981019273 19980430  
Priority Number(s): DE19981019273 19980430  
IPC Classification: A61K38/13; A61K9/107  
EC Classification: A61K38/13, A61K9/107D, A61K9/16H4, A61K9/51  
Equivalents: AU4035199, ☐ EP1073426 (WO9956733), ☐ WO9956733

---

**Abstract**

---

The invention relates to solid, particulate lipid-based excipients which are loaded with cyclosporin. Said excipients have improved biopharmaceutical properties for cyclosporins in vivo, are of a better quality (in terms of fineness, homogeneity of the particles, inclusion of the medicament) and are more physical stable in the particulate formulation (no aggregation or gel formation). The invention also relates to a therapeutic treatment with cyclosporin formulations which produce an average blood level concentration in the steady state range of 300 ng/ml to over 1000 ng/ml, preferably over 800 ng/ml, especially up to 900 ng/ml, preferably 400 ng/ml to 800 ng/ml in the absence of high initial blood level concentrations essentially over 1500 ng/ml, especially over 1200 ng/ml. This blood level concentration is preferably maintained for an extended period of at least 5 hours, preferably at least 7 hours.



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 19 273 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 38/13**  
A 61 K 9/107

⑳ Aktenzeichen: 198 19 273.8  
㉔ Anmeldetag: 30. 4. 98  
㉓ Offenlegungstag: 11. 11. 99

DE 198 19 273 A 1

㉑ Anmelder:  
Pharmatec International, S. Giuliano Milanese, IT  
  
㉒ Vertreter:  
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

㉑ Erfinder:  
Müller, Rainer, Prof. Dr., 12161 Berlin, DE; Ravelli,  
Vittorino, Dr., Mailand/Milano, IT; Runge, Stephan  
Anton, Dr., 13509 Berlin, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
US 57 02 475 A  
Coiffard, C.: Les liposomes: modèles  
expérimentaux  
et applications thérapeutiques. In: Lyon Pharma-  
ceutique 1997, Vol.48, S.113-116;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Pharmazeutische Ciclosporin-Formulierung mit verbesserten biopharmazeutischen Eigenschaften, erhöhter physikalischer Qualität und Stabilität sowie Verfahren zur Herstellung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Ciclosporin-beladene feste partikuläre Arzneistoffträger auf Lipidbasis mit verbesserten biopharmazeutischen Eigenschaften für Ciclosporine in vivo, verbesserter Qualität (Feinheit und Gleichförmigkeit der Partikel, Arzneistoffeinschluß) und verbesserter physikalischer Stabilität der partikulären Formulierung (Ausbleiben von Aggregation und Gelbildung). Ferner umfaßt die Erfindung eine therapeutische Behandlung mit Ciclosporin Formulierungen, die eine mittlere Blutspiegelkonzentration im Steady State Bereich von 300 ng/ml bis über 1000 ng/ml, vorzugsweise über 800 ng/ml, insbesondere bis 900 ng/ml, bevorzugt von 400 ng/ml bis 800 ng/ml unter Abwesenheit hoher initialer Blutspiegelkonzentrationen über 1200 ng/ml erzeugt, die vorzugsweise über einen verlängerten Zeitraum von mindestens 5 h, vorzugsweis mindestens 7 h anhält.

DE 198 19 273 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung beschreibt mit Ciclosporin (gelegentlich auch Cyclosporin geschrieben) oder Ciclosporinderivaten natürlichen und/oder synthetischen Ursprungs beladene partikuläre Systeme mit verbesserten biopharmazeutischen Eigenschaften für Ciclosporine in vivo, verbesserter Qualität (Feinheit und Gleichförmigkeit der Partikel, Arzneistoffeinschluß) und verbesserter physikalischer Stabilität der partikulären Formulierung (Ausbleiben von Aggregation und Gelbildung).

## Hintergrund der Erfindung

Ciclosporine sind cyclische Oligopeptide. Es handelt sich um eine Gruppe natürlicher Oligopeptide von Ciclosporin A bis Ciclosporin Z. Synthetische Derivate sind ebenfalls beschrieben worden (SDZ IMM 125, Hydroxyethyl Derivat des D-Serin-8-Ciclosporins).

Ciclosporin A ist ein lipophiles Molekül bestehend aus 11 Aminosäuren. Es wird durch Pilz-Fermentierung gewonnen. Das Molekulargewicht beträgt 1203.

Handelsprodukte: Sandimmun®, Sandimmun Optoral® (außerhalb Deutschlands = Sandimmun Neoral®) [A. Meinzer, E. Müller, J. Vonderscher, Perorale Mikroemulsionsformulierung – Sandimmun Optoral®/Neoral®, in: Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, R.H. Müller und G.E. Hildebrand (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 169–177, 1998].

Ciclosporin A wird vorzugsweise als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen eingesetzt. Andere Anwendungsgebiete sind Autoimmunerkrankungen, Psoriasis und Diabetes. Alle Ciclosporine – natürliche und synthetische – können in dieser Erfindung genutzt werden.

Die Ciclosporine sind sehr lipophile Stoffe und in Wasser nur sehr schwer löslich (z. B. Ciclosporin A: < 0,004% m/V in Wasser bei 25°C). Die hohe Lipophilie und schlechte Wasserlöslichkeit sind die Hauptprobleme für die Herstellung einer geeigneten pharmazeutischen Zubereitung. Aufgrund der besseren Löslichkeit in fetten Ölen und Alkohol wurde Sandimmun® mit diesen Inhaltsstoffen als Lösungsvermittler für die orale Anwendung in Form eines Emulsionskonzentrates entwickelt. Das Emulsionskonzentrat besteht aus 100 mg Ciclosporin, gelöst in 1 ml einer Mischung aus Öl, Ethanol und einem Emulgator, Macrogolglycerol-trioleat-linolat. Das Konzentrat muß vor Gebrauch verdünnt werden, z. B. durch Einrühren mit einem Löffel in kalte Milch, Kakao oder in Fruchtsaft. Diese nicht-standardisierte, ineffiziente Mischungsprozedur führt zur Bildung einer groben, inhomogenen o/W Emulsion mit relativ großer Tröpfchengröße. In vivo variiert die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe im Extremfall zwischen 10% bis 60% [T. Beveridge, A., Gratwohl, F., Michot, et al., Curr. Ther. Res., 30 (5), 1981].

Neben der Formulierung als Trinklösung ist Sandimmun® auch als Kapsel erhältlich. Die Kapseln enthalten 25 mg/100 mg Ciclosporin A aufgelöst in einer Mischung von Öl, Ethanol und Emulgator. In diesem Fall wird die ölige Zubereitung im Magen durch peristaltische Bewegungen dispergiert. Es handelt sich auch hier um ein ineffizientes Verfahren der Öldispargierung.

Alternativ wurde die Ciclosporin A-beladene Ölphase in weiteren Untersuchungen auch schon mit Hilfe der Hochdruckhomogenisation behandelt. Dies führte zu einer feineren O/W Emulsion [Dietl, H., Pharmaceutical preparation containing cyclosporin(s) for oral administration and process for producing same, United States Patent 5,637,317, 1997]. Dieses Patent beinhaltet jedoch keinerlei Daten über die physikalische Stabilität der homogenisierten Emulsion während der Lagerung und keine in vivo Daten, die beweisen, daß der Homogenisationsprozeß zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit führen kann. Es ist bekannt, daß Ciclosporin – dispergiert in der Ölphase einer O/W Emulsion – nach einigen Tagen präzipitiert und große Kristalle durch auskristallisierenden Arzneistoff in der Emulsion bildet bzw. aus der Ölphase herausgedrängtes Ciclosporin aufschwimmt und auf der Oberfläche einen Rand oder Film bildet. Dieses Problem ist beispielsweise auch für die Sandimmun Trinkemulsion bekannt. Zusätzlich ist bekannt, daß die Einarbeitung eines Arzneistoffes in die Ölphase einer O/W Emulsion die physikalische Stabilität der Emulsion durch auftretende Koaleszenz neigung verringern kann [S.S. Davis, Pharmaceutical aspects of i.v. fat emulsions, J. Hosp. Pharm., 32, 149–170, 1974]. Die geringe Tröpfchengröße ist nicht der alleinige entscheidende Faktor zur Erhöhung der Ciclosporin Bioverfügbarkeit. Die Homogenisation der Emulsion wird nicht alleine automatisch zur Bioverfügbarkeitserhöhung führen, da die gewöhnliche Ciclosporin A-Resorption zum großen Teil auch von der Gallensalzsekretion beeinflusst wird. [A. Meinzer, E. Müller, J. Vonderscher, Perorale Mikroemulsionsformulierung – Sandimmun Optoral™/Neoral™, in Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, R.H. Müller und G.E. Hildebrand (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1998]. Neben dem Ausmaß der Ausschüttung von Gallensalzen ist die Aufnahme von Nahrung während der Arzneistoffresorption ein bedeutender Faktor, der die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin beeinflussen kann. Außerdem ist die Arzneistofffreisetzung aus Emulsionen abhängig vom Verteilungskoeffizienten. Dieser Einfluß kann kaum kontrolliert werden, um nicht-variable verlängerte Blutspiegel zu erreichen. Diese Nachteile von O/W Emulsionen (d. h. grobdispersen Emulsionen) sind bereits für andere Ciclosporin Emulsionen beschrieben worden [z. B. A. Tibell et al., Cyclosporin A in fat emulsion carrier. Immunosuppressive effect in vitro, J. Immunol. 35, 231–236, 1992].

Die nächste Entwicklungsstufe war der Austausch der grobdispersen Sandimmun® Formulierung durch die Mikroemulsion Sandimmun Optoral®. Dies führte zu einer nahezu von der Gallensalzsekretion unabhängigen Resorption von Ciclosporin A [A. Meinzer, E. Müller, J. Vonderscher, Perorale Mikroemulsionsformulierung – Sandimmun Optoral™/Neoral™, in Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, R.H. Müller und G.E. Hildebrand (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, p. 176, 1998]. Eine Mikroemulsion beinhaltet keine diskreten Tröpfchen. Es handelt sich um eine "kritische Lösung" [B.W. Müller, Mikroemulsionen als neue Wirkstoffträgersysteme, in Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, R.H. Müller und G.E. Hildebrand (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 161–168, 1998; B.W. Müller, H.J. Franzky, C.J. Kölln, US Patent Nr. 4,719,239, 1988]. Die orale Gabe der Ciclosporin A-Mikroemulsion reduziert die Variabilität der Resorption, führte jedoch zu hohen initialen Blutspiegelpeaks, deutlich über dem Grenzwert von 1000 ng/ml (Abb. 1, rechts). Diese Blutspiegelpeaks sollten in einer optimierten Zubereitung verhindert werden.

Momentan sind die hauptsächlichen technologischen und biopharmazeutischen Probleme von Ciclosporin A-Formulierungen:

1. die pharmazeutische Qualität und physikalische Stabilität der Zubereitung (z. B. grobdisperse Emulsion, Bildung von Ciclosporin A-Kristallen, Koaleszenz).
2. die hohe Variabilität der Blutspiegel.
3. Blutspiegelpeaks > 1000 ng/ml, die toxische Nebenwirkungen begründen.

Aufgabe der Erfindung sollte die Beseitigung der oben genannten Probleme bei der Herstellung und hinsichtlich der Wirkung von Ciclosporin-Formulierungen sein.

Diese Aufgabe wird durch einen Arzneistoffträger, der feste Lipidpartikel beladen mit Ciclosporin umfaßt, bzw. dessen Verwendung gelöst.

Das Ausbleiben von Blutspiegelpeaks und die verlängerte Freisetzungzeit wurde durch den Einsatz feiner Partikel von festen Lipiden erreicht. Im Gegensatz zur flüssigen Ölphase einer O/W Emulsion kann aufgrund der festen Lipidmatrix das Freisetzungsprofil durch Diffusion des Arzneistoffs in der sich abbauenden Lipidmatrix gesteuert werden.

Lipide werden aufgrund des lipophilen Charakters des Arzneistoffs Ciclosporin als idealen Kandidaten für die Einbeziehung in Lipidpartikel als Matrixmaterial bevorzugt. Zusätzlich können Lipidpartikel im Gegensatz zu Polymerpartikeln durch Hochdruckhomogenisation im industriellen Maßstab hergestellt werden. [R.H. Müller und S.J. Lucks, Europ. Patent EP 0 605 497 B1, 1996].

Die Herstellung des Arzneistoffträgers erfolgt vorzugsweise unter Ausschluß halogener organischer Lösungsmittel, und insbesondere bevorzugt unter Ausschluß von organischen Lösungsmitteln überhaupt.

Die zwei grundlegenden Herstellungstechniken sind die Heißhomogenisation und die Kalthomogenisation [C. Schwarz, W. Mehnert, J.S. Lucks, R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, J. Controlled Rel., 30, 1994, 83-96].

Für die Heißhomogenisationstechnik wird der Arzneistoff in dem geschmolzenen Lipid zunächst gelöst bzw. fein dispergiert. Anschließend wird das arzneistoffbeladene Fett in einer heißen Emulgatorlösung bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt des Lipids dispergiert und durch Rühren zu einer Voremulsion verarbeitet. Diese grobe Voremulsion wird anschließend durch Hochdruckhomogenisation bei Drücken zwischen 100 bar und 1 500 bar in einem oder mehreren Homogenisationszyklen fein dispergiert. Die Hochdruckhomogenisation erfolgt ebenfalls bei Temperaturen oberhalb des Schmelzpunktes der Lipidmatrix. Die erhaltene Nanoemulsion wird abgekühlt. Das Fett rekristallisiert und bildet feste Lipidnanopartikel (SLN).

Beim Einsatz der Kalthomogenisationstechnik verbleibt das Fett im festen Zustand, d. h. die Homogenisation findet bei Temperaturen unterhalb des Lipidschmelzpunktes statt. Zuvor wurde das arzneistoffbeihaltende Fett mit Hilfe einer Mühle, z. B. einer Mörsermühle, zu Mikropartikeln zerkleinert. Die erhaltenen Lipidpartikel werden anschließend in einer kalten Emulgatorlösung dispergiert, und mittels der Hochdruckhomogenisation homogenisiert. Die Scherkräfte und die Kavitation sind hoch genug, um das feste Lipid zu zerkleinern und ultrafeine feste Lipidpartikel, d. h. feste Lipidnanopartikel, zu bilden.

Beide Techniken wurden für die Herstellung von Ciclosporinbeladenen Lipidformulierungen in dieser Erfindung herangezogen.

Der erfindungsgemäße Arzneistoffträger umfaßt dabei insbesondere tensidhaltige oder tensidfreie Partikel eines Lipids oder einer Mischung von Lipiden, die in einem Partikelgrößenbereich von 10 nm bis 100 µm liegen und bei Raumtemperatur fest sind, wobei die Partikel der Hauptpopulation einen mittleren Teilchendurchmesser von 40 nm bis 100 µm aufweisen und herstellbar sind, indem entweder eine innere Phase (Lipidphase) in einem Dispersionsmedium (Wasser, wäßrige Lösung oder eine mit Wasser mischbare Flüssigkeit) in geschmolzener oder erweichter Form dispergiert wird, oder eine innere Phase (Lipidphase) in einem Dispersionsmedium in einer festen Form dispergiert wird, wobei die feste Phase hierbei vor dem Dispergierprozeß fein zerkleinert wird.

Die bei Raumtemperatur festem Zustand vorliegen Partikel weisen vorzugsweise einen Teilchendurchmesser von 10 nm bis 10 µm auf, wenn sie durch Hochdruckhomogenisation hergestellt worden sind, wobei die Partikel der Hauptpopulation einen mittleren PCS Teilchendurchmesser im Bereich von 40 nm bis 1000 nm besitzen. Bevorzugt weisen die Partikel der Hauptpopulation einen mittleren Teilchendurchmesser im Bereich zwischen 100 nm und 500 nm auf, wobei mit geeigneten ausgewählten Prozeßparametern und Zusätzen die PCS Teilchendurchmesser im Bereich zwischen 40 nm und 100 nm liegen können. Die Hauptpopulation besteht dabei aus der Mehrzahl der Teilchen der Population.

Als weitere Zerkleinerungsverfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Arzneistoffträgers eignen sich auch Hochgeschwindigkeits-Rührung, Ultraschall-Beschallung oder ein Mahlprozeß, insbesondere mit Einsatz von Flüssigstrahl- (jet stream) oder Luftstrahlmühlen, wobei die festen Partikel der Hauptpopulation einen mittleren Teilchendurchmesser von 0,5 µm bis 100 µm (detektiert mittels Laserdiffraktometrie) aufweisen.

Um das oral zu applizierende Volumen der Endformulierung genügend klein zu halten, ist es bevorzugt, die Lipidmatrix mit 20% des Arzneistoffs Ciclosporin A zu beladen. In früheren Untersuchungen wurde berichtet, daß eine hohe Arzneistoffbeladung der Lipidmatrix, beispielsweise eine 20% Tetracain-Beladung, zu sehr groben Dispersionen führte. Die Partikelaggregation wurde begünstigt und innerhalb der ersten Stunden nach Herstellung trat ein Geliervorgang ein [A. zur Mühlen, C. Schwarz, W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – drug release and release mechanism, Eur. J. Pharm. Biopharm., in press, 1998]. Deswegen wurde erwartet, daß die Herstellung einer Ciclosporin Lipidpartikel Dispersion bei vergleichbar hoher Arzneistoffbeladung der Lipidmatrix im Nanometerbereich mit hoher Dispersität (= geringe Partikelgröße) und einer ausreichenden physikalischen Stabilität nicht sehr wahrscheinlich wäre. Jedoch konnte der gegenteilige Effekt beobachtet werden. Die Partikelgröße der Ciclosporin-beladenen Lipid Dispersion nahm mit ansteigendem Ciclosporin Gehalt der Lipidmatrix ab und gleichzeitig verringerte sich die Polydisper-

sität der Dispersion. Ciclosporin begünstigt die Ausbildung ultrafeiner Lipidpartikel von geringer Partikelgröße und hoher Gleichförmigkeit. Die Zugabe von Ciclosporin in die Lipidmatrix erhöht die pharmazeutische Qualität der Lipidnanopartikel Dispersion mit einem Stabilitätsoptimum bei einer Arzneistoffbeladung von 20% (V/V).

Der erfindungsgemäße Arzneistoffträger weist daher einen Gehalt der inneren Phase (Lipidphase) bezogen auf die Gesamtformulierung im Bereich von 0,1% bis 40% (n/m) und insbesondere im Bereich von 1% bis 20% (m/m) auf.

Arzneistoffbeladene Lipidnanopartikel wurden bisher generell als wenig physikalisch stabil beschrieben [C. Schwarz, Feste Lipidnanopartikel: Herstellung, Charakterisierung Arzneistoffinkorporation und -freisetzung, Sterilisation und Lyophilisation, Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin, 1995]. Die De-Stabilisation dieser Formulierung erfolgt in drei Stufen:

1. Die Lipidpartikel aggregieren, wie eindeutig durch das Anwachsen der mittleren Teilchendurchmesser erkennbar ist.
2. Die Viskosität der Dispersion steigt stark an und deutet auf einen voranschreitenden Kontakt zwischen den Aggregaten hin.
3. Die Lipidnanopartikel bilden zunächst eine leicht cremige Konsistenz. Später bilden sie feste Gele.

Das Gel ist zusammengesetzt aus einem Netzwerk der Lipidpartikel. Es wurde beobachtet, daß die Bildung von Gelen von einer Reduktion der Fraktion an  $\alpha$ -Modifikation und einem gleichzeitigen Anwachsen der Fraktion der  $\beta$ - bzw.  $\beta'$ -Modifikation begleitet war [C. Freitas, R.H. Müller, Long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>). II. Influence of crystallinity of the lipid and shear forces, submitted to Eur. J. Pharm. Biopharm. 1997].

Lipidpartikel Dispersionen, die physikalisch stabil waren (keine Aggregatbildung, keine Bildung von Gelen), zeigten kaum eine Abnahme bzw. sogar noch eine leichte Zunahme der Fraktion der  $\alpha$ -Modifikation während der Lagerung. In diesem Fall wurde kein Lipidanteil in die  $\beta$ - bzw.  $\beta'$ -Modifikation transformiert [C. Freitas, R.H. Müller, Long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>). II. Influence of crystallinity of the lipid and shear forces, submitted to Eur. J. Pharm. Biopharm. 1997]. Es ist bekannt, daß die Anwesenheit von Arzneistoffen in der Lipidmatrix die Kristallisation in der stabileren  $\beta$ - bzw.  $\beta'$ -Modifikation begünstigt [B. Siekmann, Untersuchungen zur Herstellung und zum Rekrystallisationsverhalten schmelzempulger i.v. applizierbarer Glyceridnanopartikel, Dissertationsschrift, Techn. Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 1994].

Partikel aus reinem Lipid, welche normalerweise nach Produktion in einem flüssigen Zustand verblieben und eine verzögerte Rekrystallisation nach Tagen oder Wochen zeigten, konnten in ihrer Rekrystallisation durch die Einarbeitung von Arzneistoffen beschleunigt werden. Daher wurde erwartet, daß die Ciclosporin-Einarbeitung in die Lipidmatrix die Lipidpartikel Dispersion destabilisieren würde. Überraschenderweise trat das Gegenteil ein. Die Bildung der  $\beta$ - bzw.  $\beta'$ -Modifikation wurde durch Ciclosporin A verhindert, die Fraktion der  $\alpha$ -Modifikation verblieb unverändert oder wuchs während der Lagerung sogar geringfügig an. Die Ciclosporin A-beladenen Partikel waren physikalisch stabiler als die arzneistofffreien Lipidpartikel, erkennbar an der geringeren Partikelgröße und dem geringeren Partikelwachstum während der Lagerung. Ciclosporin stellt einen Stabilisator für die Lipidpartikel dar und führt zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Lipiddispersion.

Der Einsatz eines Lipids als Arzneistoffträgermatrix hat große Vorteile unter Berücksichtigung der toxikologischen Aspekte. Die meisten Bestandteile von Lipidnanopartikeln besitzen den GRAS-Status oder sind als GRAS-Substanz akzeptiert (GRAS = generally regarded as safe) [Food Additives – GRAS substances, Food Drug Cosmetic Law Reports, Chicago, 1994]. Generell können alle Lipide und alle Emulgatoren, die für die orale Gabe zugelassen sind (z. B. in Tabletten, Kapseln, Pellets, Trinklösungen und Suspensionen) für die Herstellung eingesetzt werden. Typische Lipidmatrix-Materialien sind Glyceride der Fettsäuren, die in Lebensmitteln oder im Körper vorhanden sind. Emulgatoren sind beispielsweise Lecithine, Natriumcholat, Polysorbate wie Polysorbat 80 und Block-Copolymere, wie z. B. Poloxamer 188 (ein Polyethylenpolypropylen-oxid A-B-A-Blockcopolymer mit einem mittleren relativen Molekulargewicht von 8350 g/mol, wobei das mittlere relative Molekulargewicht des Polyoxypropylenanteils 1750 g/mol beträgt und der Polyoxyethylenanteil 80% ist). Die genannten Emulgatoren sind sogar für die intravenöse Anwendung zugelassen.

Zusammenfassend kann gesagt werden: In dieser Erfindung wurde Arzneimittelträger bzw. ein Arzneimittel für ein optimales therapeutisches Behandlungsschema mit optimierten Blutspiegeln entwickelt und durch den Einsatz von Ciclosporin A-beladenen ultrafeinen Lipidpartikeln realisiert. Ciclosporin erhöhte die physikalische Qualität der Partikeldispersion durch die Bildung besonders feiner Partikel mit hoher Gleichförmigkeit. Zusätzlich wuchs die physikalische Stabilität nach Inkorporation von Ciclosporin in die Lipidpartikel während der Lagerung der Partikeldispersion an.

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

**Abb. 1:** Ciclosporin A Blutspiegel nach oraler Gabe von Sandimmun® (links) und von Sandimmun Neoral® (rechts) an Nierentransplantations-Patienten.

**Abb. 2:** Ciclosporin A Blutspiegel nach oraler Gabe an Schweinen (Mittelwert von n=3, Dosis 16 mg pro kg). Oben: Sandimmun Neoral® als Referenz, unten: Ciclosporin beladene feste Lipidpartikel (mittlerer PCS Teilchendurchmesser: 157 nm).

**Abb. 3:** Partikelgrößenverteilung von arzneistofffreien SLN (links) und Ciclosporin A-beladenen SLN (rechts) erhalten nach 1, 3 und 5 Homogenisationszyklen bei 85°C (SLN Zubereitung: 10% Imwitor 900 (eine Mischung von Mono-, Di- und Triglyceriden der Palmitin- und Stearinsäure, Monoglycidanteil ca. 40%), 2,5% Tagat® S (Polyoxyethylenglycerolmonostearat), 0,5% Natriumcholat, 87% Wasser; im Fall einer arzneistoffbeladenen SLN Suspension: 8% Imwitor 900 und 2% Ciclosporin A, 2,5% Tagat® S, 0,5% Natriumcholat, 87% Wasser) (y-Achse: Häufigkeit, x-Achse:  $\mu$ m; Laserdiffraktometrie-Daten).

**Abb. 4a:** Partikelgrößenverteilung von SLN Dispersionen mit steigendem Gehalt an Ciclosporin A, hergestellt mittels der Heißhomogenisationstechnik bei 85°C (5%, 10%, 15% und 20% Ciclosporin-Beladung bezogen auf die Lipidmatrix,

Formulierungen von Tabelle 2, Laserdiffraktometrie-Daten).

**Abb. 4b:** Partikelgrößenverteilung von SLN Dispersionen mit steigendem Gehalt an Ciclosporin A hergestellt mittels der Kalthomogenisationstechnik bei 55°C (5%, 10%, 15% und 20% Ciclosporin-Beladung bezogen auf die Lipidmatrix, Formulierungen von Tabelle 2, Laserdiffraktometrie Daten).

**Abb. 5:** Anwachsen der Partikelgröße (Laserdiffraktometrie Durchmesser d90%) und Anwachsen der Schmelzenthalpie am Beispiel von zwei zum Gelieren neigenden Modellrezepturen (10% Lipid und 5% Lipid) als eine Funktion der Lagerzeit und Lagerungsbedingungen (unter Streßbedingungen, schütteln bei 40°C) [nach: C. Freitas, R.H. Müller, Long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN™). II. Influence of crystallinity of the lipid and shear forces, submitted to Eur. J. Pharm. Biopharm. 1997]. Die Partikelgrößenbestimmung wurde durchgeführt mit Hilfe der Laserdiffraktometrie (Mastersizer E, Malvern Instruments, England), die DSC Analyse erfolgte durch eine Mettler-Toledo DSC 821e/700, Gießen, Deutschland. Die Größenanalyse der 10%-igen Lipidpartikel Suspensionen erfolgte nur an den Tagen 0, 1 und 3 nach Produktion. Am Tag 5 trat eine Gelierung der 10% Formulierung ein, die zu einer cremigen Konsistenz führte, eine Partikelgrößenanalytik war nicht mehr durchführbar.

**Abb. 6:** DSC Aufheizkurven von Imwitor 900 Bulk-Material und Imwitor 900 Lipidmatrices mit steigender gelöster Arzneistoffkonzentration von Ciclosporin A von 5% bis 30%. Die DSC Aufheizkurven wurden nach Lösen des Arzneistoffs in der Imwitor 900 Matrix bei 85° für 15 min und Auskristallisieren der Mischung für eine Stunde bei Raumtemperatur gemessen. Die Heizrate beträgt 5 Kelvin pro min, eine Mettler-Toledo DSC 821E/700 Anlage wurde eingesetzt (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland).

**Abb. 7:** Oben: Röntgendiffraktogramme von Ciclosporin A und Imwitor 900 Bulk-Material und von Ciclosporin A-beladenen festen Lipidpartikeln am Tag 1 nach Herstellung (2% Ciclosporin A, 8% Imwitor 900 (d. h. 20% Arzneistoffbeladung bezogen auf die Lipidmatrix), 2,5% Tagat® S, 0,5% Natriumcholeat, 87% Wasser). Unten: Röntgendiffraktogramme von Ciclosporin A-beladenen festen Lipidpartikeln während der Lagerung (bei 25°C am Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 30 nach Herstellung (Nonius PDS120 Pulver-Diffraktometer in einfacher Transmission mit CuK $\alpha$ -Strahlung)).

**Abb. 8:** Röntgendiffraktogramme von 2% Ciclosporin A-beladenen festen Lipidnanopartikeln (Beispiel 7) am Tag 1 nach der Herstellung (= wäßrige Suspension), direkt nach Lyophilisation und nach 180 Tagen Lagerung der gefriergetrockneten Zubereitung bei 25°C (Nonius PDS120 Pulver-Diffraktometer in einfacher Transmission mit CuK $\alpha$ -Strahlung). Die Diffraktogramme von Ciclosporin und dem Cryoprotektor Trehalose sind als Referenz beigelegt.

#### Beispiele der Endformulierung für die Patienten

Die flüssige Dispersion der Lipidpartikel kann sprühetrocknet oder gefriergetrocknet werden. Zur oralen Gabe kann das trockene Pulver in Sachets zur Rekonstitution einer Trinksuspension eingefüllt werden. Das Pulver kann auch in Kapseln eingefüllt oder zur Herstellung von Tabletten genutzt werden. Alternativ kann die wäßrige SLN Dispersion nach Einengung der Wasserphase für die Extrusion und Produktion von Pellets oder in der Granulierung für Tabletten genutzt werden. Die parenterale Applikation ist auch möglich, z. B. die intravenöse Gabe. Der ultrafeine Charakter der festen Lipidnanopartikel verhindert die Kapillarblockade und damit auch das Risiko der Embolie.

Mit der Hilfe eines solchen Arzneistoffträgers löst die vorgestellte Erfindung die vorhandenen Probleme durch ein kontrolliertes Design optimierter Blutspiegel mittels Einsatz einer feinen Dispersion physikalisch stabiler fester Lipidnanopartikel.

Ein spezielles therapeutisches Behandlungsdesign wurde entwickelt, um toxische Nebenwirkungen des Ciclosporins zu minimieren und die therapeutische Effizienz zu erhöhen. Eine Erhöhung der therapeutischen Effizienz erfolgte durch Erniedrigung der Variabilität der Absorption und durch die Erzielung einer verzögerten Freisetzung mit länger anhaltenden Blutspiegelwerten (steady state) im optimalen Therapiebereich. Der optimierte mittlere Blutspiegel dieser Erfindung verhindert Blutspiegelpeaks > 1200 ng/ml, vorzugsweise > 1000 ng/ml und idealerweise > 800 ng/ml. Der Blutspiegel verbleibt für eine gewisse Zeitperiode in dem Bereich zwischen 300 ng/ml und 900 ng/ml, vorzugsweise im Bereich zwischen 400 ng/ml und 800 ng/ml. Der Zeitbereich der gleichbleibenden Ciclosporin A-Bloodspiegel beträgt mindestens 5 h, vorzugsweise 7 h und im Idealfall länger als 8 h mit einer Arzneimittelkonzentration von 300 ng/ml bis 900 ng/ml im Blut.

**Abb. 1 (links)** zeigt die Variabilität der Blutspiegel nach oraler Gabe von Sandimmun® bei Patienten nach Nierentransplantation. [nach: A. Meinzer, E. Müller, J. Vonderscher, - Perorale Mikroemulsionsformulierung – Sandimmun Optoral™/Neoral™, in Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, R.H. Müller und G.E. Hildebrand (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, p. 175, 1998].

**Abb. 2 (unten)** zeigt als Vergleich das Ergebnis der Verwendung des erfindungsgemäßen Arzneimittelträgers bzw. des erfindungsgemäßen Behandlungsdesigns den mittleren Blutspiegel einer Schweinestudie, erhalten von drei Schweinen (Beispiel 1).

Der mittlere Blutspiegel dieses erfindungsgemäßen Behandlungsdesigns zeigt keinen Peak über 800 ng/ml über eine Zeitperiode von etwa 9 h bei einem Blutspiegel im Bereich von 300 ng/ml bis 900 ng/ml.

#### Biopharmazeutische Eigenschaften

Die perorale Gabe des Ciclosporin-beladenen Arzneimittelträgers dieser Erfindung führt zu verlängerten Blutspiegeln mit geringer Variabilität und dem Ausbleiben hoher toxischer Blutspiegelpeaks und somit dem Ausbleiben oder der Minimierung von Arzneimitteln Nebenwirkungen (wie z. B. die Nephrotoxizität von Ciclosporin).

#### Qualität der Lipidpartikel

Feste Lipidpartikel wurden durch Dispergierung einer Ciclosporin-beladenen Lipidmatrix in einer Emulgatorlösung

hergestellt. Die Einarbeitung von Ciclosporin in die Lipidmatrix verbessert die Dispersität des Lipids und erhöht die Feinheit und Größengleichheit der Lipidpartikel nach Dispergierung, verglichen zu arzneistofffreien Lipidpartikeln, hergestellt unter gleichen Bedingungen. Die Einschlußrate des Arzneistoffs in den Lipidpartikeln kann durch Steigerung des Ciclosporin Gehaltes in der Formulierung erhöht werden.

5

#### Physikalische Stabilität

Es konnte gezeigt werden, daß eine Partikelaggregation und Gelbildung (= Destabilisierung) bei Lipiddispersionen einhergeht mit der Umlagerung des Lipids von der  $\alpha$ -Modifikation in die  $\beta$ - bzw.  $\beta'$ -Modifikation. Die Einarbeitung von Ciclosporin stabilisiert die Bildung der  $\alpha$ -Modifikation, verhindert so die Umwandlung in die  $\beta$ - bzw.  $\beta'$ -Modifikation bei Lagerung und zeigt eine erhöhte physikalische Stabilität der Partikeldispersion.

Die Erfindung wurde verglichen mit dem gegenwärtig aktuellen Produkt Sandimmun Neoral®. Abb. 2 (oben) zeigt die Blutspiegelkurve nach oraler Applikation einer identischen Dosis. Der mittlere Blutspiegel von Sandimmun Neoral® zeigt einen initialen Blutspiegelpeak von etwa 1.500 ng/ml und einen Blutspiegel im Bereich von 300 ng/ml bis 900 ng/ml lediglich über einen Zeitraum von 6 h. Im direkten Vergleich zeigen beide Formulierungen, die Mikroemulsion und die Erfindungsformulierung (Abb. 2), geringe Standardabweichungen und eine ähnliche Variabilität der Bioverfügbarkeit an. Die Erfindungsformulierung vermeidet jedoch die hohe Variabilität der Blutspiegel des bisher bekannten Sandimmun® (Abb. 1, links) sowie die hohen Blutspiegelpeaks von Sandimmun Optoral® (Abb. 1, rechts und Abb. 2, oben) und erzeugt länger anhaltende Blutspiegel (steady state) mit geringer Variabilität.

15

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung und der verwendeten Substanzen

Die Erfindung ermöglicht ein optimales therapeutisches Behandlungsschema, dessen optimale Blutspiegel durch den neuartigen Arzneimittelträger, basierend auf festen, Ciclosporin-beladenen Lipidpartikeln, erreicht wird. Die Lipidpartikel sind für die orale und/oder parenterale Applikation entwickelt worden. Die Lipidmatrix kann ein Ciclosporin oder eine Mischung von zwei oder mehreren Ciclosporinen natürlicher oder synthetischer Herkunft beinhalten. Die Lipidpartikel werden vorzugsweise durch Hochdruckhomogenisation hergestellt. Um feine Partikel vorzugsweise im Nanometerbereich zu erreichen, kann beispielsweise die Homogenisation mit einem Kolbenspalthomogenisator, wie bereits in R.H. Müller und S.J. Lucks, Europäisches Patent EP 0 605 497 B1, 1996 beschrieben, eingesetzt werden. Alternativ ist die Homogenisation mit Hilfe eines Mikrofluidizers möglich. Um Lipidpartikel im Bereich von Nanometern bis zu einigen Mikrometern (100 nm bis zu 10  $\mu$ m) zu erhalten, kann die Dispergierung der Lipidpartikel auch bei einer niedrigeren Leistungsdichte, beispielsweise durch Ultraschallung oder mit Hochgeschwindigkeitsrührern erfolgen. Alternativ kann die Dispergierung mittels einer Luftstrahlmühle oder einer Flüssigmahlung durch eine Kolloidmühle durchgeführt werden.

Ölige Dispersionen, wie Sandimmun®, zeigen eine Variabilität der Bioverfügbarkeit zwischen 10% und 60% [T. Beveridge, A. Gratwohl, F. Michot, W. Niederberger, E. Nüesch, K. Nussbaumer, P. Schaub, and B. Speck, Cyclosporin A: pharmacokinetics after a single dose in man and serum levels after multiple dosing in recipients of allogenic bone-marrow grafts, Curr. Ther. Res. 30, 1981, 5-18]. Die Gabe einer Mikroemulsion als kritische Lösung von Ciclosporin (Sandimmun Optoral®) reduzierte die Variabilität der Bioverfügbarkeit, führte jedoch zu noch höheren Blutspiegelpeaks nach der oralen Gabe als bei Sandimmun® (Abb. 1, rechts). Diese hohen Blutspiegelpeaks sind verantwortlich für die toxischen Nebenwirkungen von Ciclosporin A, die während der Behandlung der Patienten auftreten können, z. B. der Nephrotoxizität [Martindale, 29<sup>th</sup> edition, J.E.F. Reynolds (ed.), London, The Pharmaceutical Press, 1989].

Ciclosporin-beladene Lipidpartikel sind lipidhaltige Dispersionen und keine Lösungen. Deswegen wurde erwartet, daß die Ciclosporinbeladenen festen Lipidpartikel ebenso wie die bekannte lipidhaltige Sandimmun® Zubereitung die bekannte Variabilität der Bioverfügbarkeit zeigen und daß die Reproduzierbarkeit der Absorption nicht ansteigt. Überraschenderweise zeigte die Ciclosporin-beladene Lipidpartikel (SLN) Suspension eine Reproduzierbarkeit der Bioverfügbarkeit ähnlich der der Sandimmun Neoral® Zubereitung, jedoch ohne die toxischen Blutspiegelpeaks (Abb. 2). Die SLN-Formulierung zeigte sogar eine verlängerte Freisetzung des Arzneistoffs und daraus sich ergebend verlängerte Blutspiegel im Bereich von 400 ng/ml bis 800 ng/ml. Solche konstanten Blutspiegel unter Abwesenheit der Blutspiegelpeaks sind das optimale Behandlungsdesign, das erfindungsgemäß möglich gemacht wird. Blutspiegel von Ciclosporinen > 1000 ng/ml, insbesondere > 1200 ng/ml werden aufgrund ihrer toxischen Nebeneffekte als kritisch angesehen. Idealerweise sollte der Blutspiegel bevorzugt in dem therapeutischen Bereich zwischen 400 ng/ml bis 800 ng/ml liegen.

Parameter zum Nachweis der Qualität und toxikologischen Akzeptanz von Ciclosporin Formulierungen sind deswegen die Prozentanteile der AUC (area under the curve) des Blutspiegels über 800 ng/ml ( $AUC_{>800\text{ng/ml}}$ ) und über 1000 ng/ml ( $AUC_{>1000\text{ng/ml}}$ ). Konsequenterweise ist die Maximalkonzentration  $C_{\text{max}}$  auch ein wichtiger Parameter, der die Konzentration von 1000 ng/ml nicht überschreiten sollte. Ein hoher initialer Blutspiegelpeak ist nicht wünschenswert, d. h. die Zeit bis zum Erreichen von  $C_{\text{max}}$  (und auch  $T_{\text{max}}$ ) sollte nicht so kurz sein, sondern eher zu späteren Zeiten detektiert werden. Aufgrund der verzögerten und gleichmäßigen Freisetzung aus Ciclosporin-beladenen Lipidpartikeln ist das Erreichen von  $T_{\text{max}}$  aus Lipidpartikeln im Gegensatz zur Sandimmun Neoral® Referenzzubereitung erst zu einem späteren Zeitpunkt detektierbar.

Tab. 1 zeigt, daß die erfindungsgemäße Ciclosporin SLN-Formulierung diese Erfordernisse erfüllt und belegt die durch die Erfindung erzielte Verbesserung der Therapie.

65



Tabelle 1

Pharmakokinetische Parameter der Ciclosporin SLN Suspension gegen Sandimmun Neoral®: Prozentualer Anteil der AUC<sub>>800ng/ml</sub> und der prozentuale Anteil der AUC<sub>>1000ng/ml</sub>, C<sub>max</sub> und T<sub>max</sub> (kalkuliert auf der Basis der mittleren Blutspiegel von Abb. 2). MW = Mittelwert

	% AUC <sub>&gt;800 ng/ml</sub>		% AUC <sub>&gt;1000 ng/ml</sub>		C <sub>max</sub> [ng/ml]		T <sub>max</sub> [h]	
	SLN	Neoral™	SLN	Neoral™	SLN	Neoral™	SLN	Neoral™
MW (n = 3)	0,4%	6,5%	1,7%	11,7%	745,7	1467,7	6	1,5

Normalerweise ist die Qualität von Lipidpartikeln (Feinheit und Gleichförmigkeit der Partikelgröße) am höchsten, wenn die Arzneistoffbeladung niedrig bleibt [A. zur Mühlen, C. Schwarz, W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – drug release and release mechanism, Eur. J. Pharm. Biopharm., accepted, 1997]. Die Erhöhung der Arzneistoffkonzentration führte bei den Modellarzneistoffen Tetracain und Etomidat zur Partikelaggregation und schließlich bei einer 10%igen Etomidatkonzentration zur Bildung eines Gels [C. Schwarz, Feste Lipidnanopartikel: Herstellung, Charakterisierung Arzneistoffinkorporation und -freisetzung, Sterilisation und Lyophilisation, Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin, 1995]. Mit wachsender Ciclosporin-Beladung von 0% bis 20% trat das Gegenteil ein (Tab. 2, Beispiel 2):

1. Die Qualität der Partikel gemessen an der Partikelgröße und -verteilung der arzneistoffbeladenen SLN war besser, als die der arzneistofffreien SLN (d. h. kleinere, feinere Partikel mit enger Verteilung).
2. Eine steigende Arzneistoffbeladung erhöhte die Qualität der Partikel der Suspension (Tab. 3, Beispiel 2).

Die Produktion einer arzneistofffreien SLN Suspension führte zur Bildung einer breiten Partikelgrößenverteilung (gemessen mit Hilfe der Laserdiffraktometrie). Mehr als 25% der Partikel waren größer als 1 µm bei einer Größe bis zu 80 µm (Abb. 3, oben links). Drei Homogenisationszyklen reduzierten die Fraktion der Partikel > 1 µm, jedoch nicht die Breite der Verteilung (Abb. 3, Mitte links). Fünf Homogenisationszyklen führten sogar zu einer Partikelaggregation, wie sie durch ein Anwachsen der Verteilungswerte der Partikelgrößenverteilungskurve im Größenbereich von 60 µm bis 80 µm erkennbar ist (Abb. 3, unten links).

Im Gegensatz dazu führte bei einer Ciclosporin-beladenen SLN Zubereitung bereits ein Homogenisationszyklus zu einer sehr engen Partikelgrößenverteilung mit einem geringen Anteil von Partikeln > 1 µm (etwa 5%) nach Beladung der Lipidpartikel mit 20% des Arzneistoffs Ciclosporin (Abb. 3, oben rechts). Drei Homogenisationszyklen führten zu einer extrem gleichförmigen Verteilung mit weniger als einem Prozent der Partikel > 1 µm (Abb. 3, Mitte rechts, Tab. 3 in Beisp. 2). Die bei der arzneistofffreien SLN Suspension beobachtete Destabilisation (Aggregation und Bildung von großen Partikeln) nach fünf Homogenisationszyklen trat bei den Ciclosporin-beladenen Partikeln nicht auf. Die Größenverteilung war praktisch identisch zu der Größenverteilung nach drei Homogenisationszyklen (Abb. 3, Mitte und unten rechts).

Lipidpartikel wurden mit steigender Ciclosporin Konzentration, bezogen auf die Lipidmatrix, hergestellt: 5%, 10%, 15%, 20% (Zubereitung: Beisp. 2, Tab. 2). Die Größenanalysenwerte für Lipidpartikel, die mit der Heißhomogenisationstechnik hergestellt wurden, sind in Tab. 3 (Beisp. 2, Laserdiffraktometrie Daten, Volumenverteilungswerte) gezeigt. Der LD-Durchmesser d50% sank mit steigender Arzneistoffbeladung, bei einer 20%igen Ciclosporin-Beladung bezogen auf die Lipidmatrix betrug der d50% Teilchendurchmesser 310 nm. Eine extreme Abnahme wurde für die volumenbezogenen Partikeldurchmesser d95% und d99% gemessen. Der Partikeldurchmesser d99% ist ein sehr empfindlicher Parameter, um die Größengleichförmigkeit der Partikelpopulation zu beweisen. Er ist besonders empfindlich, wenn die Kalkulation der Partikelgröße über die Volumenverteilung erfolgt. Die starke Abnahme beweist die Reduktion in der Fraktion von Partikeln im µm-Bereich und auf diese Weise einen Zuwachs der Größengleichförmigkeit. So sank z. B. der Durchmesser d99% von etwa 60 µm (Mittelwert von n=3, 5% Ciclosporin-Beladung der Lipidphase) auf einen Wert von 860 nm (Mittelwert aus n=3, 20% Ciclosporin-Beladung der Lipidmatrix).

Die Partikelgrößenverteilung der Formulierungen mit ansteigender Ciclosporin Konzentration aus Tab. 3 sind in Abb. 4a (Heißhomogenisation bei 85°C) und in Abb. 4b (Kalthomogenisation bei 55°C) graphisch dargestellt. Derselbe Effekt – ansteigende Gleichförmigkeit mit ansteigender Ciclosporin Konzentration innerhalb der Lipidmatrix – wurde bei Anwendung der Kalthomogenisationstechnik beobachtet (Beispiel 3, Tab. 4).

Die Einkapselungsrate des Arzneistoffs in den Lipidpartikeln wird bestimmt durch die Löslichkeit in der Matrix C<sub>0</sub> (Öl/Lipidphase) und dem Dispersionsmedium C<sub>w</sub> (Wasser), d. h. aufgrund des Verteilungskoeffizienten k (= C<sub>0</sub>/C<sub>w</sub>). Daher wird bei anwachsender Arzneistoffkonzentration in der Formulierung eine konstante Einkapselungsrate erwartet, wenn man gleichzeitig unterhalb der Maximallöslichkeit des Arzneistoffs in einer der beiden Phasen bleibt, d. h. Lipid oder Wasser. Beispielsweise führt die Übersättigung der Wasserphase aufgrund der erhöhten Temperatur und daraus folgend der erhöhten Löslichkeit des Arzneistoffs zur Bildung von Arzneistoffkristallen nach dem Abkühlen der Dispersion (z. B. Prednisolon in [A. zur Mühlen, C. Schwarz, W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – drug release and release mechanism, Eur. J. Pharm. Biopharm., in press 1998]). Im Gegensatz dazu wurde mit ansteigender Arzneistoffkonzentration von 0,5% bis 2,0% bezogen auf die Gesamtformulierung (= 5% bis 20% Ciclosporin A kalkuliert als Prozentsatz der Lipidphase) ein Ansteigen der relativen Einkapselungsrate von 95,4% bis zu 97,8% nach der Herstellung mittels der Heißhomogenisationstechnik bei 85°C erhalten (Beispiel 5, Tab. 5). Nach Herstellung der Lipiddispersion mittels der Kalthomogenisationstechnik wurde ein Anstieg der relativen Einkapselungsrate von 78,5% bis 93,9% erzielt (Beispiel 6, Tab. 6). In der Wasserphase wurden keine Arzneistoffkristalle gefunden. Die Konzentration

des Arzneistoffs in der Wasserphase verblieb unterhalb der Sättigungslöslichkeit der emulgatorhaltigen Wasserphase.

Die Einarbeitung von Ciclosporin – besonders bei ansteigenden Konzentrationen – erhöhte die Qualität der produzierten Partikel, insbesondere die Feinheit, Gleichförmigkeit und die Einkapselungsrate des Arzneistoffs in der Lipidmatrix. Zusätzlich wurde die physikalische Stabilität der Arzneistoff-beladenen Formulierung während der Lagerung erhöht. Als physikalische Instabilitäten gelten Partikelaggregation und insbesondere im Fall von Lipidpartikeln die Bildung von Gelen. Arzneistofffreie Inwitor 900 Lipidpartikel zeigten eine hohe Polydispersität nach Herstellung und aggregierten stark während der ersten 5 Tage der Lagerung. Sie bildeten große mikroskopisch erkennbare Aggregate mit einer Größe von etwa 0,5 µm bis 1 µm. Lipidpartikel beladen mit 20% Ciclosporin waren eindeutig stabiler, und dies sogar bei Lagerung unter Streßbedingungen bei 40°C. Beispielsweise stieg, bezogen auf die Volumenverteilung der Partikel, der LD Durchmesser d50% lediglich von 0,32 µm auf 0,40 µm, der LD Durchmesser d90% von 0,62 µm auf 0,84 µm an (nach 3-tägiger Lagerung).

In vorhergehenden Arbeiten mit Lipidpartikeln wurde festgestellt, daß die Lipidpartikel nach der Herstellung hauptsächlich in der  $\beta'/\beta_1$ - bzw.  $\beta$ -Modifikation auskristallisierten und nur teilweise in der weniger stabilen  $\alpha$ -Modifikation. Im Falle von physikalisch instabilen Partikeln nahm der Anteil der  $\beta'$ - bzw.  $\beta_1$ -Modifikation während der Lagerung zu, der Anteil der  $\alpha$ -Modifikation nahm ab bei gleichzeitiger Partikelaggregation und Bildung von Gelen. Zusätzlich kam es zu einem Anwachsen der Schmelzenthalpienwerte während der Partikelaggregation, die Schmelzenthalpienwerte stiegen nochmals bei der Bildung von Gelen [C. Freitas, R.H. Müller, Long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>). II. Influence of crystallinity of the lipid and shear forces, submitted to Eur. J. Pharm. Biopharm. 1997]. Abb. 5 zeigt das Anwachsen der Partikelgröße (LD-Daten), die Bildung von Gelen und das Anwachsen der Schmelzenthalpie (DSC-Daten) von instabilen Partikeln.

Im Falle physikalisch stabiler Lipidpartikel Dispersionen zeigte der Anteil der  $\beta$ - bzw.  $\beta'$ -Modifikation wenig oder keine Änderung. Der Anteil der  $\alpha$ -Modifikation verblieb unverändert oder stieg sogar etwas an. Ein Ansteigen der Schmelzenthalpie war kaum zu beobachten.

Ciclosporin fördert die Ausbildung der  $\alpha$ -Modifikation bei gleichzeitiger Reduktion der  $\beta$ - bzw.  $\beta'$ -Modifikation. Dieser Effekt wird immer deutlicher bei steigender Konzentration von Ciclosporin in der Lipidmatrix (Beispiel 4, Abb. 6).

Bei Ciclosporin-beladenen Lipidpartikeln kam es nur zu einem geringen Anwachsen der Schmelzenthalpie, z. B. 9,2 J/g am ersten Tag nach der Herstellung, 9,5 J/g am Tag 14 (20% Ciclosporin-Beladung in der Lipidmatrix, Lagerung unter Streßbedingungen bei 40°C). Diese Eigenschaften der Lipidpartikel sind in dem Zusatz von Ciclosporin begründet und stehen voll in Übereinstimmung mit der beobachteten erhöhten physikalischen Stabilität im Vergleich zu arzneistofffreien Inwitor 900 Lipidpartikeln.

Es ist von Suppositorien bekannt, daß in die Lipidmatrix eingearbeitete Arzneistoffe während der Lagerung aus der Lipidmatrix herausgedrängt werden können (Arzneistoffexklusion) [B.W. Müller, Suppositorien, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1989]. Diese Arzneistoffauslagerung tritt auch beim Verdünnen des öligen Emulsionskonzentrates Sandimmun® in wäßrigen Dispersionsmedien ein und führt zur Ausbildung großer Arzneistoffkristalle in der Wasserphase oder Aufschwimmen des Arzneistoffs auf der Wasseroberfläche. Aus diesem Grund liegt die klassische Sandimmun® Formulierung wasserfrei als öliges Emulsionskonzentrat vor. Das Phänomen der Arzneistoffexklusion ist ein generelles Problem für alle O/W Dispersionen, z. B. auch andere Ciclosporinbeladene Emulsionen [Dietl, H., Pharmaceutical preparation containing cyclosporins(s) for oral administration and process for producing same, United States Patent 5,637,317, 1997]. Der flüssige Zustand der Fettphase in Emulsionen erleichtert die Arzneistoffexklusion verglichen zu festen Suppositorien. Die Arzneistoffexklusion ist offensichtlich weniger ausgeprägt, wenn die Öltropfen sehr fein sind, z. B. im unteren Nanometerbereich wie beispielsweise im Fall der Verdünnung der Mikroemulsion Sandimmun Neoral® in wäßrigen Dispersionsmedien.

Ausgehend von diesen Tatsachen sind der feste Zustand der Lipidpartikel und die feine Tropfengröße die Hauptvorteile, um die Arzneistoffexklusion zu verhindern oder zumindest stark zu reduzieren. Das Vorliegen des kristallinen Zustands kann durch Röntgendiffraktogramme der wäßrigen festen Lipidpartikel Dispersion untersucht werden. Die Diffraktogramme zeigen während 30-tägiger Lagerung keine Änderung (Abb. 7, unten). Grundsätzlich sind trockene Produkte unter dem Gesichtspunkt der Langzeitstabilität vorzuziehen. Im Gegensatz zu Dispersionen begünstigen sie die Konservierung der physikalischen Stabilität unter Berücksichtigung wirtschaftlicher Aspekte. In den meisten Ländern sind Produkte mit einer langen Haltbarkeit, d. h. einer minimalen physikalischen Stabilität, von 3 Jahren erforderlich. Deswegen wurden die festen Lipidpartikel in trockene Produkte durch Gefriertrocknung (Beispiel 7) und durch Sprühtrocknung (Beispiel 8) überführt. Röntgendiffraktometrie-Untersuchungen der gefriergetrockneten Pulver nach 6-monatiger Lagerung zeigten die Erhaltung der Struktur der Partikel und des amorphen Charakters des in die Lipidmatrix eingearbeiteten Ciclosporins. Es konnten keine Ciclosporin Kristalle detektiert werden, nur kristalline Streupeaks der Trehalose als Cryoprotektor der Formulierung waren nach 180 Tagen Lagerung detektierbar (Abb. 8).

Die Erfindung basiert darauf, daß gefunden wurde, daß die Zugabe von Ciclosporin zu einer Lipidmatrix die Dispersität des Lipids erhöht, die Bildung kleiner Partikel begünstigt, die Gleichförmigkeit der Partikelgröße zunimmt, die Einkapselungsrate mit steigender Ciclosporin-Beladung ansteigt, die physikalische Stabilität der Partikeldispersion während der Lagerung erhöht wird, die Bildung der  $\alpha$ -Modifikation innerhalb der Lipidmatrix fördert und die Struktur der Lipidmatrix insbesondere die Fraktion der  $\alpha$ -Modifikation des Lipids und den amorphen Charakter des eingeschlossenen Arzneistoffs auch nach Lagerung beibehält, insbesondere in Form eines trockenen Partikelproduktes (z. B. erhalten durch Gefriertrocknung). Ein besonderes Merkmal dieser Erfindung ist deswegen der Einsatz von Ciclosporin im Herstellungsprozeß von Lipidpartikeln.

Die Herstellung von Lipidpartikeln gemäß der Erfindung findet durch Dispergierung der Ciclosporin-beladenen Lipidphase in ihrer geschmolzenen Form oder in festem Zustand statt. Unterschiedliche Dispergierungsprozesse können angewendet werden. Die vorzugsweise benutzte Technik ist die Hochdruckhomogenisation, wie sie bereits von Müller und Lucks beschrieben wurde [R.H. Müller and J.S. Lucks, Europäisches Patent EP 0 605 497 B1, 1996]. Die Hochdruckhomogenisation führt zu Partikeln mit einem durch Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmten mittleren Teilchendurchmesser im Bereich von etwa 40 nm bis 1000 nm, d. h. zu sogenannten festen Lipidnanopartikeln (SLN®) beladen

mit Ciclosporin. Alternativ zu dieser Herstellungstechnik können auch andere Dispergiertechniken angewendet werden, z. B. Homogenisation mit Hilfe eines Microfluidizers (Microfluidics Inc. USA). Ciclosporin-beladene Partikel mit einer größeren Partikelgröße können durch Dispergierung des geschmolzenen oder festen Fettes mit Hilfe eines Hochgeschwindigkeitsrührers oder anderer Dispergierwerkzeuge hergestellt werden, wie von R.H. Müller bereits in der Applikation PCT/EP97/06893 beschrieben wurde. Es ist daher eine Zubereitung von Matrix-Arzneiformen (z. B. Tabletten, Pellets) basierend auf Ciclosporin-beladenen Mikropartikeln möglich. Diese Dispergiergeräte haben eine niedrigere Leistungsdichte im Bereich der Dispergierzone und führen daher zu größeren Lipidpartikeln, z. B. mit mittleren Teilchendurchmessern von einigen  $\mu\text{m}$  bis zu  $20\ \mu\text{m}$  oder Partikelpopulation im Bereich von  $40\ \mu\text{m}$  bis  $100\ \mu\text{m}$ , wie in der Literatur und Standardlehrbüchern bereits ausgiebig beschrieben ist.

Beispielsweise wird Ciclosporin bei erhöhten Temperaturen (wie  $80^\circ\text{C}$  bis  $90^\circ\text{C}$ ) in der geschmolzenen Lipidphase gelöst oder dispergiert. Alternativ kann Ciclosporin in das Lipid durch Präzipitation der lipophilen Matrix aus einem Lösungsmittel, in dem Lipid und Ciclosporin gleichzeitig löslich sind, inkorporiert werden. Die Lipidmatrix kann Ciclosporin in molekulardisperser Form, in amorphen Clustern oder in Form ultrafeiner Kristalle (z. B. Ciclosporin-Nanokristalle in Lipidpartikeln) beinhalten.

Im Fall der Heißhomogenisationstechnik wird die Ciclosporinhaltige Lipidschmelze in einer heißen wäßrigen Emulgatorlösung durch Rühren dispergiert, z. B. durch den Gebrauch eines Rotor-Stator-Systems (Ultra Turrax® oder Silverson), oder durch die Anwendung eines Blattührers, eines Propellerrührers, einer Zahnscheibe etc. Anstatt der Einarbeitung des Emulgators in die Wasserphase kann der Emulgator alternativ in die Lipidschmelze eingearbeitet werden. Dies ist besonders vorteilhaft im Fall eines lipophilen Emulgators oder Lecithins. Im Fall der Nutzung von zwei oder mehreren Emulgatoren können alle Emulgatoren in einer Phase (Wasser oder Lipid) oder in unterschiedlichen Phasen gelöst werden. Die erhaltene O/W Voremulsion wird anschließend durch Hochdruckhomogenisation homogenisiert. Beispielsweise kann ein Kolben-Spalt-Homogenisator wie der Micron Lab 40, Lab 60 und/oder Gaulin 5,5 (APV-Homogenizer GmbH, Lübeck, Deutschland) bei Drücken typischerweise zwischen 100 bar und 1500 bar in einem oder mehreren Homogenisationszyklen eingesetzt werden. Die erhaltene Nanoemulsion wird abgekühlt, die flüssige Ölphase erhärtet und bildet Ciclosporin-beladene feste Lipidnanopartikel (SLN).

Im Fall des Einsatzes der Kalthomogenisationstechnik wird die arzneistoffenthaltende Schmelze abgekühlt. Die Emulgatoren werden genau so benutzt wie bereits bei der Heißhomogenisationstechnik beschrieben wurde. Das erhärtete Fett wird gemahlen, z. B. in einer Mörsermühle, um ein grobes Pulver zu erhalten. Falls erforderlich kann Trockeneis oder flüssiger Stickstoff zugesetzt werden, um die Sprödigkeit des Lipids während des Mahlvorgangs zu erhöhen. Das gemahlene Lipid wird in einer kalten Emulgatorlösung dispergiert und die erhaltene Lipid-Suspension im festen Zustand homogenisiert. Die Homogenisationstemperatur bleibt unterhalb der Schmelztemperatur des Lipids. Im Falle einer möglichen Hitzentwicklung während des Herstellungsprozesses sollte eine Homogenisationstemperatur deutlich unterhalb des Schmelzpunktes des Lipids verwendet werden (z. B. durch Gegenkühlung), um ein Schmelzen des Lipids während des Homogenisationsvorganges zu verhindern. Bei der Hochdruckhomogenisation liegt die Temperatur in der Regel zumindest  $5^\circ$  unterhalb der Schmelztemperatur des Fettes. In den meisten Fällen wird die Kalthomogenisation bei Raumtemperatur durchgeführt, eine Kühlung unterhalb Raumtemperatur ist auch möglich.

Als dispergierte Phase können Lipide im weitesten Sinn als individuelle Komponente oder als Mischung angewendet werden.

Beispiele dafür sind: Natürliche oder synthetische Triglyceride bzw. Mischungen derselben, Monoglyceride und Diglyceride, alleine oder Mischungen derselben oder mit z. B. Triglyceriden, selbstemulgierende modifizierte Lipide, natürliche und synthetische Wachse, Fettalkohole, einschließlich ihrer Ester und Ether sowie in Form von Lipidpeptiden, oder irgendwelche Mischungen derselben. Besonders geeignet sind synthetische Monoglyceride, Diglyceride und Triglyceride als individuelle Substanzen oder als Mischung (z. B. Hartfett), Imwitor 900, Triglyceride (z. B. Glyceroltrilaurat, Glycerolmyristat, Glycerolpalmitat, Glycerolstearat und Glycerolbehenat) und Wachse wie z. B. Cetylpalmitat und weißes Wachs (DAB).

Der Anteil der inneren oder Lipidphase bezogen auf die Gesamtformulierung ist 0,1% bis 40% (m/m) und liegt vorzugsweise im Bereich von 1% bis 20% (m/m). Sollte der Zusatz von dispersionsstabilisierenden Additiven notwendig oder gewünscht sein, z. B. Emulgatoren, um stabile Dispersion zu produzieren zu können, so können diese in Form von reinen Substanzen oder in Form von Mischungen eingearbeitet sein, um die Partikel zu stabilisieren.

Die Menge an solchen Additiven, die im Verhältnis zu der gesamten Einwaage der wäßrigen Dispersion zugesetzt werden können, liegt im Bereich von 0,01% bis 20% und vorzugsweise im Bereich von 0,5% bis 10%.

Die folgenden Substanzen können als stabilisierende Zusätze gebraucht werden:

1. Tenside, im besonderen ethoxylierte Sorbitanfettsäure-Ester, Blockpolymere und Block-Copolymere (wie z. B. Poloxamere und Poloxamine), Polyglycerinether und Polyglycerinester, Lecithine unterschiedlicher Herkunft (z. B. Eilecithin oder Sojalecithin), chemisch modifizierte Lecithine (z. B. hydrierte Lecithine), genauso wie Phospholipide und Sphingolipide, Mischung von Lecithinen mit Phospholipiden, Sterolen (z. B. Cholesterol und Cholesterol-Derivate, genauso wie Stigmasterin), Ester und Ether von Zuckern oder von Zuckeralkoholen mit Fettsäuren oder Fettalkoholen (z. B. Saccharose-Monostearat);
2. sterisch stabilisierende Substanzen wie Poloxamere und Poloxamine (Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Block-Copolymere), ethoxylierte Sorbitanfettsäure-Ester, besonders Polysorbate (z. B. Polysorbat 80 bzw. Tween® 80), ethoxylierte Mono- und Diglyceride, ethoxylierte Lipide, ethoxylierte Fettalkohole oder Fettsäuren, und
3. geladene ionische Stabilisatoren und Peptisatoren so wie Diacetylphosphate, Phosphatidylglycerin, genauso wie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Natriumcholat, Natriumglycocholat, Natriumtaurocholat oder ihrer Mischungen, Aminosäuren oder Peptisatoren, wie z. B. Natriumcitrat [J.S. Lucks, B. W. Müller, R. H. Müller, Int. J. Pharmaceutics 63, 183–188, 1990].
4. Viskositäts erhöhende Substanzen wie z. B. Cellulose-Ether und Cellulose-Ester (z. B. Methylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose), Polyvinyl derivate sowie Polyvi-

nylalkohol, Polyvinylpyrrolidon Polyvinylacetat, Alginate, Polyacrylate (z. B. Carbopol®), Xanthane und Pektine.

Die Ladungsstabilisatoren sind, wenn notwendig oder gewünscht, vorzugsweise in Bezug auf die Basisformulierung mit 0,01% bis 10% (m/m) inkorporiert und insbesondere in einer Menge von 0,05% bis zu 2%.

- 5 Viskositätserhöhende Substanzen sind, wenn notwendig oder erwünscht, im ähnlichen Verhältnis zur Basisformulierung eingearbeitet, vorzugsweise in einer Menge von 0,01–10% und insbesondere in einer Menge von 0,1% bis 10% (m/m) und vorzugsweise im Bereich zwischen 0,5% und 5%.

Als äußere Phase (= Dispersionsmedium, kontinuierliche Phase) können Wasser, wäßrige Lösungen oder Flüssigkeiten mischbar mit Wasser, sowie Glycerin oder Polyethylenglykol eingesetzt werden. Die wäßrigen Lösungen können für diesen Zweck nicht-isotonisch oder isotonisch sein. Wäßrige Lösungen sind Mischungen von Wasser mit einer oder mehreren anderen Komponenten wie: Glycerin, Mannose, Glukose, Fruktose, Xylose, Trehalose, Mannitol, Sorbitol, Xylitol oder andere Polyole, sowie Polyethylenglykole, ebenso Elektrolyte wie beispielsweise Natriumchlorid. Diese Komponenten werden dann proportional zu der Basisformulierung in einer Menge von 0,1 Gew.-% bis 50 Gew.-% und vorzugsweise in einer Menge zwischen 1 Gew.-% und 30 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtformulierung, zugesetzt.

- 15 Tensidfreie SLN werden hergestellt durch Dispergierung der Lipidphase in einer wässrigen Lösung, die eine oder mehrere viskositätserhöhende Substanzen enthält, entweder allein oder in Kombination mit anderen Substanzen, sowie Zucker, Zuckeralkohole, besonders Glukose, Mannose, Trehalose, Mannitol, Sorbitol sowie andere. Desweiteren ist es möglich, eine Kombination der viskositätserhöhenden Stoffe oder die Kombination dieser mit Zuckern oder Zuckeralkoholen, oder in einer weiteren Kombination mit Ladungsstabilisatoren oder Peptisatoren zu gebrauchen. Geeignete Peptisatoren sind beispielsweise Natriumcitrat, Natriumpyrophosphat, Natriumsorbitat.

Die Einarbeitung von Ciclosporin in die Lipidmatrix kann nach unterschiedlichen Methoden erfolgen:

1. durch Lösen von Ciclosporin in der inneren Phase;
2. durch Lösen von Ciclosporin in einem Lösungsmittel, das mit der inneren Phase mischbar ist und der inneren Phase zugesetzt wird. Das Lösungsmittel wird anschließend, wenn erforderlich, teilweise oder komplett entfernt;
- 25 3. durch Dispergierung des Ciclosporins in der Lipidphase (z. B. durch die Dispergierung von feingemahlenem Ciclosporin (beispielsweise nano-große Cyclosporinkristalle) oder einer kontrollierten Präzipitation des Ciclosporins im Lipid oder Lipid-Lösungsmittel-Gemisch);
- 30 4. durch Lösen des Ciclosporins in der äußeren wäßrigen Phase und Einschluß der aktiven Substanz während des Produktionsprozesses in einem partikelstabilisierenden Tensidfilm;
5. durch Adsorption von Ciclosporin an die Oberfläche von Partikeln; (es sind Freisetzungsforschungen durchgeführt worden, die zeigen, daß eine schnelle Freisetzung von bis zu 20% erfolgt ist, was anzeigt, daß zumindest ein Teil des Arzneistoffs auf der Oberfläche lokalisiert war).
- 35 6. durch Lösen des Ciclosporin in der Lipidphase mit Hilfe eines lösungsvermittelnden Zusatzes (z. B. einem Block-Copolymer oder einem Sorbitan-Fettsäureester) und anschließendem Dispergieren der Lipidphase um eine Prä-Emulsion oder eine Prä-Suspension herzustellen. Ciclosporin liegt dann in der Lipidmatrix als eine feste Lösung vor.

40 Sterilisation kann angewendet werden gemäß den Anweisungen des Arzneibuchs, z. B. durch Autoklavieren bei 110° oder  $\gamma$ -Bestrahlung oder anderen anerkannten Verfahren. Eine weitere mögliche Technik der Keimreduktion ist die Tyndalisierung.

#### Beispiel 1

45 Ciclosporin A beladene Lipidpartikel wurden hergestellt durch Lösen des Arzneistoffs und Tagat® S in der geschmolzenen Imwitor 900 Lipidmatrix bei 85°C. Die heiße Schmelze wurde mit einem Rotor-Stator Rührer in einer wäßrigen Natriumcholat-Lösung bei 85°C dispergiert und die erhaltene Voremulsion mit einem Micron LAB 40 (APV Homogenizer GmbH, Lübeck, Deutschland) homogenisiert. Die Hochdruckhomogenisation erfolgte in 3 Zyklen bei 500 bar und 85°C. Die Formulierung enthielt 8% Imwitor 900, 2% Ciclosporin A (das entspricht 20% Cyclosporin bezogen auf die Lipidmatrix), 2,5 Tagat® S, 0,5% Natriumcholat und 87% destilliertes Wasser.

50 Diese Formulierung wurde in einer Dosierung von 16 mg/kg an drei Schweinen oral appliziert. Die Gabe der Zubereitung erfolgte nach Verdünnen der SLN Dispersion mit Wasser zu 40 ml über einem Magenkatheter, der Katheter wurde anschließend mit 200 ml Wasser gespült. Die Schweine wurden 4 h nach der oralen Gabe gefüttert. Die Blutspiegelkurven wurden abgebildet als Funktion der Zeit, die Gehaltsbestimmung von Ciclosporin erfolgte über einen validierten Immuno-Enzym-Assay (EMIT). Als Referenz wurde Sandimmun Neoral® (Novartis Pharma AG Basel, Schweiz) bei gleicher Dosierung in gleicher Art und Weise (Verdünnung zu 40 ml und orale Gabe über den Magenkatheter, spülen mit 200 ml Wasser) angewendet. Der mittlere Blutspiegel der 3 Versuchstiere für jede der beiden Zubereitungen wird in Abb. 2 gezeigt (oben: Sandimmun Neoral® als Referenz, unten: Ciclosporin A-beladene feste Lipidnanopartikel).

#### 60 Beispiel 2

Feste Lipidnanopartikel (SLN) Dispersionen mit ansteigender Ciclosporin-Beladung (5%, 10%, 15%, 20%) wurden mit Hilfe der Heißhomogenisationstechnik hergestellt. Die Produktion erfolgte durch Schmelzen der Lipidphase bei 85°C, lösen des Arzneistoffs und Tagat® S in der Schmelze durch Rühren, Zusatz der arzneistoffbeladenen Schmelze zu einer wäßrigen Natriumcholat-Lösung und Herstellung einer Voremulsion durch Rühren mit einem Rotor-Stator (Ultra Turrax® T 25 einschließlich der Dispergiereinheit N 18 G, Jahnke & Kunkel, Stauffen, Deutschland). Die Voremulsion wurde bei 85°C mit einem temperaturkontrollierten Micron LAB 40 Kolben-Spalt Homogenisator (APV Homogenizer GmbH, Lübeck, Deutschland) bei 500 bar in 3 Homogenisationszyklen homogenisiert. Die Zusammensetzung der SLN

Formulierungen sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tabelle 2

Zusammensetzung der SLN-Formulierung mit ansteigendem Anteil an Ciclosporin A. Die Prozentanteile von Ciclosporin sind kalkuliert als Prozentanteile der gesamten Formulierung und als Prozentanteile der Lipidmatrix (\*). Die Lipidmatrix (Imwitor 900 und Ciclosporin A) bleibt konstant bei 10% der Gesamtformulierung

5% Ciclosporin-beladene Imwitor 900 SLN Suspension				
Imwitor 900	Ciclosporin A	Tagat® S	Natriumcholat	Aqua dem.
9,5%	0,5% (= 5%*)	2,5%	0,5%	ad 100%

10% Ciclosporin-beladene Imwitor 900 SLN Suspension				
Imwitor 900	Ciclosporin A	Tagat® S	Natriumcholat	Aqua dem.
9,0%	1,0% (= 10%*)	2,5%	0,5%	ad 100%

15% Ciclosporin-beladene Imwitor 900 SLN Suspension				
Imwitor 900	Ciclosporin A	Tagat® S	Natriumcholat	Aqua dem.
8,5%	1,5% (= 15%*)	2,5%	0,5%	ad 100%

20% Ciclosporin-beladene Imwitor 900 SLN Suspension				
Imwitor 900	Ciclosporin A	Tagat® S	Natriumcholat	Aqua dem.
8,0%	2,0% (= 20%*)	2,5%	0,5%	ad 100%

Die Partikelgrößen wurden mit Hilfe der Laserdiffraktometrie (LD) mit einem Mastersizer E (Malvern Instruments, England) bestimmt. Die LD Durchmesser d50%, d95% und d99% wurden ausgewählt, um die Feinheit der Partikeldispersionen zu bestimmen und zu charakterisieren. Die Partikelgrößenwerte sind in Tab. 3 aufgelistet, die Größenverteilungskurven in Abb. 4a dargestellt.

Tabelle 3

LD Durchmesser D50%, D95% und D99% der Ciclosporinbeladenen SLN-Formulierungen von Tab. 2 hergestellt durch Heißhomogenisation (mittlerer Teilchendurchmesser von n=3) (Laserdiffraktometrie Daten, Volumenverteilung)

	d50% [µm]	d95% [µm]	d99% [µm]
Arzneistoffbeladung 5%	0,40	34,56	60,62
Arzneistoffbeladung 10%	0,34	0,81	5,68
Arzneistoffbeladung 15%	0,32	0,70	1,24
Arzneistoffbeladung 20%	0,31	0,69	0,86

Beispiel 3

Feste Lipidnanopartikel (SLN) Dispersionen mit ansteigender Ciclosporin A-Beladung (5%, 10%, 15%, 20%) wurden identisch in der Zusammensetzung zu Beispiel 2 (Tab. 2) produziert, jedoch durch Anwendung der Kalthomogenisationstechnik. Nach dem Lösen des Arzneistoffs und des Tagat S® in der Lipidschmelze wurde die Schmelze abgekühlt und in einer Mörsermühle für 10 min gemahlen (Mörsermühle, Fa. Retsch, Hahn, Deutschland). Die erhaltenen groben Partikel wurden in einer wäßrigen Natriumcholat-Lösung mit Hilfe eines Ultra Turrax® dispergiert. Die erhaltene Suspension wurde bei 55° homogenisiert, d. h. etwa 5°C unterhalb des Schmelzbereichs von Imwitor 900 (Schmelzbereich

# DE 198 19 273 A 1

59°C bis 61°C). Ein temperaturkontrollierter Micron Lab 40 (APV Homogenizer GmbH, Lübeck, Deutschland) wurde verwendet und die Homogenisation fand in 3 Homogenisationszyklen bei Raumtemperatur statt. Die Partikelgrößen wurden mit Hilfe der Laserdiffraktometrie (LD) ermittelt (Mastersizer E, Malvern Instruments, England). Die LD Durchmesser d50%, d95% und d99% wurden zur Charakterisierung der Feinheit der Partikel der Dispersion herangezogen und sind in Tab. 4 gezeigt, die korrespondierenden Größenverteilungskurven in Abb. 4b.

Tabelle 4

LD Durchmesser d50%, d95% und d99% der Arzneistoffbeladenen SLN Formulierungen von Tab. 2 produziert mit Hilfe der Kalthomogenisation (mittlerer Teilchendurchmesser von n=2) (Laserdiffraktometrie Daten, Volumenverteilung)

	d50% [µm]	d95% [µm]	d99% [µm]
Arzneistoffbeladung 5%	0,69	37,56	71,80
Arzneistoffbeladung 10%	0,49	10,37	51,90
Arzneistoffbeladung 15%	0,46	10,53	23,93
Arzneistoffbeladung 20%	0,59	10,82	24,43

Beispiel 4

Physikalische Lipid-Arzneistoff-Mischungen von Imwitor 900 und Ciclosporin A wurden mit steigendem Anteil an Ciclosporin A von 0%-30% hergestellt. Ciclosporin A wurde in Imwitor 900 durch Erwärmen für 15 min auf 85°C gelöst, anschließend die Lipidmatrix mit inkorporiertem gelöstem Arzneistoff wieder abgekühlt. Die DSC Aufheizkurven dieser so erhaltenen Mischungen zeigen ein Anwachsen der Fraktion der weniger stabilen  $\alpha$ -Modifikation (Abb. 6).

Beispiel 5

Die Einkapselungsrate wurde mit Hilfe der HPLC-Analytik bestimmt, die SLN-Partikel waren hierbei mit ansteigendem Ciclosporin A Gehalt beladen. Die Partikel wurden mit Hilfe der Heißhomogenisationstechnik in 3 Homogenisationszyklen bei 500 bar und 85°C hergestellt (Zusammensetzung: siehe Tab. 2). Die Einkapselungsrate ist definiert als der Prozentsatz der totalen Arzneistoffkonzentration in der Formulierung, der innerhalb der Partikel eingeschlossen ist (100% Arzneistoff in der Formulierung sind gleich X Prozent im Lipidpartikel plus Y Prozent freier Arzneistoffanteil in der wäßrigen Phase). Die Daten sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tabelle 5

Einkapselungsraten mit ansteigender Ciclosporin A Beladung, die Partikelherstellung erfolgte durch die Heißhomogenisationstechnik bei 85°C (Mittelwert von n = 3)

	Einkapselungsrate
Arzneistoffbeladung 5%	95,4%
Arzneistoffbeladung 10%	96,5%
Arzneistoffbeladung 15%	97,5%
Arzneistoffbeladung 20%	97,8%

Beispiel 6

Die Einkapselungsrate wurde bestimmt mit Hilfe der HPLC-Analyse von SLN-Partikeln mit ansteigendem Arzneistoffanteil in der Lipidmatrix, die Partikel wurden hergestellt durch die Kalthomogenisationstechnik bei 3 Zyklen und 55°C (Zusammensetzung: siehe Tab. 2). Die Daten sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tabelle 6

Einkapselungsrate mit ansteigender Ciclosporin-Beladung, die Partikelherstellung erfolgte durch die Kalthomogenisationstechnik bei 55°C

	Einkapselungsrate
Arzneistoffbeladung 5%	78,5%
Arzneistoffbeladung 10%	89,7%
Arzneistoffbeladung 15%	92,0%
Arzneistoffbeladung 20%	93,9%

## Beispiel 7

Eine wässrige Lösung von 10% Trehalose (m/m) wurde im Verhältnis 1 : 1 mit einer wässrigen festen Lipidpartikel Dispersion (8% Imwitor 900, 2% Ciclosporin A, 2,5% Tagat S<sup>®</sup>, 0,5% Natriumcholat, 87% destilliertes Wasser) gemischt und gefriergetrocknet. Der Einfrierprozeß wurde bei -20°C in Injektionsflaschen mit 2 ml der Trehalose-Lipidpartikel-Mischung durchgeführt, die Gefriertrocknung erfolgte in einer Gamma-2-20 Anlage der Fa. Christ, Osterode i.H., Deutschland für 24 h bei -10°C und einem Vakuum von 0,370 bar. Die Nach Trocknung der Suspension fand bei 0°C, 370 mbar in einem Zeitraum von 12 h statt. Das Produkt war ein trockenes und flockiges Pulver, Ciclosporin war in der Lipidmatrix in einem amorphen Zustand eingekapselt, wie mit Hilfe der Weitwinkelröntgendiffraktometrie nachgewiesen werden konnte. Die Röntgenstrukturanalyse des Produktes erfolgte am Tag 1 nach Gefriertrocknung und am Tag 180 nach Lagerung bei 25°C (Abb. 8). Nach 180-tägiger Lagerung kristallisierte lediglich Trehalose aus, wie deutlich an den Streupeaks in Winkelbereichen von 2 Theta = 13° und höher erkennbar ist. Ciclosporin verblieb über den gesamten Lagerungszeitraum in einem amorphen Zustand, was deutlich an der Abwesenheit von typischen Ciclosporin Kristallpeaks im Streumuster in Abb. 8 erkennbar wird (2 Theta = 7° bis 13°).

## Beispiel 8

Ein Betrag von 10% Trehalose (m/m) in einer 10%-igen ethanolischen wässrigen Lösung wurde im Verhältnis 1 : 1 mit einer wässrigen festen Lipidpartikel Dispersion (8% Imwitor 900, 2% Ciclosporin A, 2,5% Tagat S<sup>®</sup>, 0,5% Natriumcholat, 87% destilliertes Wasser) vermischt. Die erhaltene Mischung wurde an einem Minibüchi (Büchi, Schweiz) sprühtrocknet. Die Sprühtrocknungsparameter waren: 95°C Inlet Temperatur, 45°C Outlet Temperatur, 1 ml/min Flußrate. Das Produkt war ein trockenes und flockiges Pulver. Ciclosporin war in die Lipidmatrix in einer amorphen Form eingekapselt.

## Beispiel 9

Zubereitungen von 2 kg SLN Dispersionen wurden an einem modifizierten Lab 60 Kolben-Spalt Homogenisator (APV Homogenizer GmbH, Lübeck, Germany) produziert. Der Homogenisator verfügte über temperierbare Gefäße, Leitungen und Homogenisationsventile wie beschreiben in [R.H. Müller, S. Gohla, G.E. Hildebrand, S.A. Runge, A. Dingler, Dispersion of solid lipids – solid lipid nanoparticles (SLN): Production and possible applications in food, cosmetic and pharmaceutical products, World Congress on Emulsion, Bordeaux, 1-2-195, 1997]. Der 10 kg Zulaufbehälter war mit einer Zahnscheibe ausgestattet, der Produktaufangbehälter mit einem 4-blättrigen Edelstahl-Propellerrührer. Die Produktion erfolgte im kontinuierlichen Umlaufbetrieb, d. h. nach dem Passieren des Homogenisationsspaltes und erfolgter Homogenisation wurde das fein dispergierte Produkt in den Zulaufbehälter direkt zurückgeführt, um eine erneute Homogenisation zu ermöglichen.

40,0 g Ciclosporin A (2.0%) wurden bei 85°C in 160,0 g geschmolzenem Imwitor 900 (8,0%) mit 50,0 g Tagat S<sup>®</sup> (2,5%) unter Rühren gelöst. Die Schmelze von 250,0 g wurde in 1750 g Wasser mit 10,0 g Natriumcholat (0,5%) dispergiert. Bei 85°C erfolgte die Homogenisation mit 500 bar im kontinuierlichen Umlaufbetrieb über 20 min. Die Formulierungen wurden mit ansteigenden Homogenisationszeiten in 5 min.-Stufen zubereitet (Tab. 7). Die Partikelgrößenanalyse erfolgte mittels der Laserdiffraktometrie (Mastersizer E, Malvern Instr., UK) und Photonenkorrelationsspektroskopie (Coulter N4Plus, Coulter Electr., USA).

Tabelle 7

Partikelgrößenanalyse einer 21 Zubereitung von 2%-igen Ciclosporin A-beladenen Lipidpartikel Dispersionen hergestellt mit Hilfe der Heißhomogenisationstechnik an einem modifizierten LAB 60 Kolbenspalt-Hochdruck-Homogenisator. Die Zubereitungen wurden mit ansteigender Homogenisationszeit hergestellt (5 min, 10 min, 15 min, 20 min). La-

# DE 198 19 273 A 1

serdiffraktometrie Daten (LD Durchmesser d50% und d95%, Volumenverteilung), Photonenkorrelationsspektroskopie  
Daten (mittlerer PCS Teilchendurchmesser)

Zubereitung.	Homogenisationszeit	Partikelgrößen-Parameter
1	5 min	LD Durchmesser d50% 0,40 µm LD Durchmesser d95% 0,99 µm PCS Durchmesser 221 nm
2	10 min	LD Durchmesser d50% 0,33 µm LD Durchmesser d95% 0,77 µm PCS Durchmesser 199 nm
3	15 min	LD Durchmesser d50% 0,31 µm LD Durchmesser d95% 0,69 µm PCS Durchmesser 184 nm
4	20 min	LD Durchmesser d50% 0,31 µm LD Durchmesser d95% 0,68 µm PCS Durchmesser 180 nm

## Beispiel 10

40,0 g Ciclosporin (=2%) wurden bei 80°C in 160,0 g geschmolzenen Imwitor 900 (8,0%) inklusive 50,0 g Tagat S<sup>®</sup> (2,5%) durch Rühren gelöst. Die Schmelze von 250,0 g wurde in 1750 g Wasser inklusive 10,0 g Natriumcholat (0,5%) dispergiert. Die Emulsion wurde mit einer Zahnscheibe für 1 min bei 150 U/min bei 80°C dispergiert (Tab. 8). Die Partikelgrößenanalyse wurde mit Hilfe der Laserdiffraktometrie und Photonenkorrelationsspektroskopie durchgeführt (Mastersizer E für die Laserdiffraktometrie, Malvern Instruments, England und Coulter N4 Plus für die Photonenkorrelationsspektroskopie, Coulter Electronics, USA).

Tabelle 8

Die Partikelgrößenanalyse einer 2 l Zubereitung einer 2% Ciclosporin A-beladenen Lipidpartikel Dispersion nach Rühren mit einer Zahnscheibe (Ø = 15 cm) bei 85°C mit 150 U/min. Laserdiffraktometrie Daten (LD Durchmesser d50% und d95%, Volumenverteilung), Photonenkorrelationsspektroskopie Daten (mittlerer PCS Teilchendurchmesser)

LD Durchmesser d50%	0,83 µm
L5 LD Durchmesser d95%	19,33 µm
PCS Durchmesser	322 nm

## Beispiel 11

800 mg Ciclosporin wurden bei einer Temperatur von 85°C in 3200 mg geschmolzenem Compritol 888 ATO durch Rühren gelöst. Die Schmelze (4,0 g) wurde in 36,0 g Wasser dispergiert. Die wäßrige Lösung beinhaltete Polysorbat 80 und Sojalecithin (Lipoid S75). Die Emulgator-Konzentration war 1360 mg bzw. 120 mg (kalkuliert als Anteil der Gesamtformulierung von 40,0 g, entsprechend 3,4% für Polysorbat 80 und 0,3% für Lipoid S 75). Bei 85°C wurde mit Hilfe der Heißhomogenisation bei einem Druck von 500 bar und 3 Homogenisationszyklen die Lipiddispersion homogenisiert (Tab. 9). Die Partikelgrößenanalyse wurde mit Hilfe der Laserdiffraktometrie und Photonenkorrelationsspektroskopie durchgeführt (Mastersizer E für die Laserdiffraktometrie, Malvern Instruments, England und Coulter N4 Plus für die Photonenkorrelationsspektroskopie, Coulter Electronics, USA).

Tabelle 9

Partikelgrößenanalyse einer 2% Ciclosporin-beladenen Lipidpartikel Dispersion mit Compritol 888 ATO als Lipidmatrix (8%), Ciclosporin (2%), Polysorbat 80 (3,4%) und Sojalecithin (Lipoid S 75, 0,3%) als Emulgatoren in destilliertem



# DE 198 19 273 A 1

Wasser (86,3%). Laserdiffraktometrie Daten (d50%, d95% und d99%, Volumenverteilung), Photonenkorrelationsspektroskopie Daten (PCS mittlerer Teilchendurchmesser, Polydispersitätsindex (PI))

LD Durchmesser d50%	0,33 µm	5
LD Durchmesser d95%	0,91 µm	
LD Durchmesser d99%	3,00 µm	
PCS Durchmesser	163 nm	
PCS Polydispersitätsindex	0,339	

## Beispiel 12

800 mg Ciclosporin wurden bei 85°C in 3200 mg geschmolzenem Precirol ATO 5 als Lipidmatrix durch Rühren gelöst. Die Schmelze von 4,0 g wurde dispergiert in 36,0 g Wasser mit Poloxamer 188 und Natriumcholat (kalkuliert auf die Gesamtformulierung von 40,0 g, entsprechend 2,5% Poloxamer 188 und 0,5% Natriumcholat) als Emulgatoren. Die Heißhomogenisation und Partikelgrößenanalyse (Tab. 10) wurde entsprechend dem Beispiel 11 durchgeführt.

## Tabelle 10

Partikelgrößenanalyse einer 2% Ciclosporin-beladenen Lipidpartikel Dispersion mit Precirol ATO 5 als Lipidmatrix (8%), Ciclosporin (2%), Poloxamer 188 (2,5%) und Natriumcholat (0,5%) als Emulgatoren in destilliertem Wasser (87%). Laserdiffraktometrie Werte (d50%, d95% und d99%, Volumenverteilung), Photonenkorrelationsspektroskopie Daten (mittlerer PCS Teilchendurchmesser, Polydispersitätsindex (PI))

LD Durchmesser d50%	0,30 µm	25
LD Durchmesser d95%	0,74 µm	
LD Durchmesser d99%	5,73 µm	
PCS Durchmesser	193 nm	
PCS Polydispersitätsindex	0,312	30

## Beispiel 13

800 mg Ciclosporin wurden bei 85°C in 3200 mg geschmolzenem Bienenwachs durch Rühren gelöst, die Schmelze von 4,0 g wurde in 36,0 g Wasser mit Polysorbat 80 als Emulgator dispergiert. Die Emulgatorkonzentration betrug 480 mg (kalkuliert auf die Gesamtformulierung von 40,0 g entspricht das 1,2%). Die Heißhomogenisation und Partikelgrößenanalyse (Tab. 11) wurde entsprechend den Ausführungen in Beispiel 11 durchgeführt.

## Tabelle 11

Partikelgrößenanalyse einer 2% Ciclosporin-beladenen Lipidpartikel Dispersion mit Bienenwachs als Lipidmatrix (8%), Ciclosporin (2%) und Polysorbat 80 (1,2%) als Emulgator in destilliertem Wasser (88,8%). Laserdiffraktometrie Daten (d50%, d95% und d99%, Volumenverteilung) Photonenkorrelationsspektroskopie Daten (mittlerer PCS Teilchendurchmesser, Polydispersitätsindex (PI))

LD Durchmesser d50%	0,36 µm	40
LD Durchmesser d95%	1,20 µm	
LD Durchmesser d99%	3,51 µm	
PCS Durchmesser	279 nm	
PCS Polydispersitätsindex	0,148	50

## Beispiel 14

### Herstellung von SLN mit Tetracain

Zur Herstellung von mit Tetracain beladenen Lipidpartikeln wurden 0,40 g Tetracain in 3,60 g geschmolzenem Inwitor 900 gelöst (= 10% Arzneistoff in der Lipidphase), 1,00 g Tagat S der Schmelze zugesetzt und diese dann in 35,0 g heißem Wasser, dem 0,20 g Natriumcholat zugesetzt war, mit einem Rotor-Stator dispergiert. Die Gesamtmenge enthielt somit 10% Lipidphase (9% Lipid und 1% Tetracain). 2,5% Tagat S, 0,5% Natriumcholat, und 87% Wasser. Die erhaltene Rohemulsion wurde mit einem LAB 40 bei 85°C und einem Druck von 500 bar mit 3 Zyklen homogenisiert. Nach Abkühlen bildeten sich feste Lipidpartikel. Partikelgrößenanalytik mit einem Laserdiffraktometer (MasterSizer E, Malvern Instruments) ergab einen Durchmesser 50% von 0,39 µm, Durchmesser 95% von 65 µm und Durchmesser 99% von 77 µm.

Zur Herstellung von mit Tetracain beladenen Lipidpartikeln mit 20% Arzneistoff in der Lipidphase wurde 0,80 g Tetracain in 3,20 g geschmolzenem Inwitor 900 gelöst und dann wie oben verfahren. Die Partikelgrößenanalytik ergab einen Durchmesser 50% von 0,44 µm, Durchmesser 95% von 71 µm und Durchmesser 99% von 78 µm. Erhöhung des Arzneistoffgehalts erhöht die Polydispersität.

Zur Herstellung von mit Tetracain beladenen Lipidpartikeln unter Verwendung von Compritol als Lipid wurde identisch zur Herstellung von mit Tetracain beladenen Imwitor 900 Partikeln verfahren. Bei 10% Arzneistoffgehalt in der Lipidphase ergaben sich ein Durchmesser 50% von 0,45 µm, Durchmesser 95% von 75 µm und Durchmesser 99% von 79 µm.

- 5 Bei 20% Arzneistoffgehalt in der Lipidphase ergaben sich ein Durchmesser 50% von 0,39 µm, Durchmesser 95% von 73 µm und Durchmesser 99% von 79 µm.

Ersatz von Cyclosporin durch Tetracain führte zu extrem polydispersen Partikelpopulationen, bei 10% Arzneistoff in der Lipidphase liegen 95% der Partikel in einem breiten Bereich von 0,1–65 bzw. 75 µm bei Imwitor 900 bzw. Compritol als Lipid (Vergleich Cyclosporin aus Beispiel 2 : 0,1–0,8 µm).

- 10 Die Erhöhung des Arzneistoffanteils führte zu keiner Verbesserung der Homogenität wie sie z. B. bei Cyclosporin-Partikeln beobachtet wurde, der Durchmesser 99% bleibt unverändert bei ca. 78 µm (Vergleich Cyclosporin aus Beispiel 2, bei Erhöhung von 10% auf 20% Cyclosporin Erniedrigung des Durchmessers 99% von 5,68 Mm auf 0,86 µm).

#### Problematik der Ciclosporin-Therapie und des notwendigen Drug Monitoring

- 15 Die Bestimmung der Pharmakokinetik von Ciclosporin ist sowohl abhängig von der Art des biologischen Mediums (Blut vs. Plasma oder Serum) als auch von der Assay-Methode (radioimmunoassay (RIA) vs. Hochdruckflüssigkeitsschromatographie (HPLC)). Aufgrund dieser Abhängigkeiten sind die Interpretation von pharmakokinetischen Daten und die Bestimmung einer Korrelation zwischen Konzentration in biologischen Flüssigkeiten und therapeutischen und/
- 20 oder toxischen Effekten dieses Arzneistoffes sehr schwierig. Die am häufigsten auftretende und klinisch wichtigste Nebenwirkung von Ciclosporin ist die Dosis-abhängige Nephrotoxizität. Höhere Blutspiegel von Ciclosporin führen zu einem Anfluten höherer Konzentrationen des Arzneistoffs in den Nieren, was zu einer Vielzahl unterschiedlicher histologischer Veränderungen führt. Aufgrund dieser häufigen Komplikation erfordert die Ciclosporin-Therapie zwingend eine Individualisierung der Dosierung über intensives teures und zeitaufwendiges Monitoring der Blutspiegel und renalen
- 25 Funktion. Mediziner in der Klinik führen ein Monitoring regelmäßig durch, das heißt während der frühen Posttransplantations-Periode täglich oder 3–4 mal pro Woche, nach 6 Monaten bis 1 Jahr nach Transplantation Reduzierung auf 1 mal monatlich. Das Monitoring erfolgt dabei im allgemeinen anhand der sogenannten Trough Blutspiegel, das heißt dem auslaufenden Blutspiegel nach dem ersten Plasmapeak (z. B. 24 Stundenwert).

- 30 Dosierung, Blutspiegel, therapeutische Effizienz und Toxizität von Ciclosporin

- Maximale Blutspiegelkonzentrationen (Peaks) von Ciclosporin (bestimmt mit HPLC) sind ungefähr 1,4–2,7 ng/ml pro 1 mg von einer peroral applizierten Dosis von einer konventionellen Formulierung (z. B. Sandimmun) in gesunden Erwachsenen. Die Formulierung von Ciclosporin als eine Emulsion (Sandimmun Neoral/Optoral) hat eine höhere Bioverfügbarkeit, was zu höheren Blutspiegelpeaks und zu einer größeren Fläche unter der Arzneistoffkonzentration/Zeit-Kurve führt (AUC).

- Mit RIA gemessene Trough Blutspiegelkonzentrationen (nach 24 Stunden) von 250–800 ng/ml scheinen sowohl die Häufigkeit der Organabstoßung als auch Ciclosporin induzierte Nebenwirkungen zu minimieren. Eine Verbindung zwischen Trough Serumkonzentrationen (gemessen mit RIA) oberhalb von 500 ng/ml (korrespondierende Blutkonzentrationsbereich 700–1350 ng/ml) und Ciclosporin-indizierter Nierentoxizität wurde berichtet.

- 40 Tabelle 12 gibt eine Zusammenfassung von klinischen Human-Daten, die den Effekt der Dosis auf die (mit RIA gemessene) maximale Blutspiegelkonzentration zeigt (nach Daten der AHFS, American Hospital Formulary Service, 1997, pp. 2862–2873). Zu Vergleichszwecken sind die Daten der an Schweinen durchgeführten Studie eingeschlossen um den Effekt der Erfindung zu demonstrieren.

45

50

55

60

65

Tabelle 12

Applizierte Dosis und maximale Blutspiegelkonzentration (gemessen mit RIA). Vergleich: Daten aus Studie an Schweinen

Species	Formulierung	Dosis (mg/kg)	C <sub>max</sub> (ng/ml)
Erwachsener, de novo Nierentransplantation	Neoral	7,95 (täglich)	1802 (nach 4 Wochen)
Erwachsener, de novo Lebertransplantation	Neoral	6,9 (täglich)	1555 (nach 4 Wochen)
7-15 Jahre alt, stabiles Nierentransplantat	Neoral	3,7 (zweimal täglich)	1827
3 Jahre alt, stabiles Lebertransplantat	Neoral	4,15 (zweimal täglich)	1050
Schwein	Neoral	16 Einmaldosis	1467,7
Schwein	SILN	16 Einmaldosis	745,7

Die Applikation einer durchschnittlichen Erhaltungsdosis von Ciclosporin (z. B. 8 mg/kg) für einen 70 kg schweren erwachsenen Patienten mit existierenden Trough Blutspiegelwerten von 700–1350 ng/ml würde in einer maximalen Blutspiegelkonzentration (Peak) zwischen 1484 ng/ml und 2863 ng/ml resultieren (berechnet auf der Basis von HPLC-Daten für Sandimmun, Daten laut Hersteller). Berücksichtigt man die niedrigere Sensitivität von HPLC im Vergleich zu RIA und die gleichzeitig höhere Bioverfügbarkeit von Neoral, so können noch höhere Blutspiegelmaxima für Neoral angenommen werden. Basierend auf diesen Daten können toxische Blutspiegelwerte für Ciclosporin oberhalb von 1500 ng/ml angenommen werden. Die Applikation höherer Erhaltungsdosen zur Erzielung eines therapeutisch vorteilhaften höheren Trough Blutspiegels würde bei den bisherigen Formulierungen Peaks bis weit in den toxischen Blutspiegelbereich ergeben.

#### Klinische Vorteile der Erfindung

Die Abb. 2 und die von der Schweinestudie erhaltenen pharmakokinetischen Daten zeigen, daß man als eine überraschende und einmalige Eigenschaft der Erfindung eine dramatische Reduktion (50%) und eine Verzögerung der maximalen Blutkonzentrationen im Vergleich zu Neoral bei identischer intragastrinaler Dosierung erhält. Die Trough Blutspiegel für beide Präparate sind ähnlich und die AUC Werte sind vergleichbar innerhalb der pharmazeutischen Bioäquivalenz-Grenzwerte. Es ist allgemein anerkannt, daß die gastrointestinale Anatomie des Schweins der des Menschen vergleichbar ist und die Daten von Studien in Schweinen in adäquaterweise den grundsätzlichen Verlauf im Menschen widerspiegeln. Die mit der erfindungsgemäßen Formulierung erzielte stark erniedrigte maximale Blutspiegelkonzentration und die Verzögerung ihres Eintritts ist aus den folgenden Gründen überaus vorteilhaft für die Ciclosporin-Therapie:

1. Signifikant reduziertes Risiko für Nierentoxizität
2. Höhere Flexibilität in der Erhöhung der Dosierung aufgrund erniedrigter bzw. ausbleibender Plasmapeaks.
3. Die Dosiserhöhung ermöglicht erstmalig die Einstellung höherer Trough Blutspiegel, was zur Verminderung von Abstoßungsreaktionen führt (höhere therapeutische Effizienz)
4. Reduzierung der Häufigkeit von bisher notwendigem – teurem und zeitintensivem – regelmäßigem Monitoring von Ciclosporinblutspiegelkonzentrationen und regelmäßiger Überprüfung der renalen Funktion.

Die oben genannten Vorteile der erfindungsgemäßen Formulierung sind von speziellem Vorteil in der pädiatrischen Therapie mit Ciclosporin, und zwar nicht nur zur Verhinderung der Organabstoßung sondern auch für eine Reihe von entzündlichen schwer therapierbaren Erkrankungen (z. B. Morbus Crohn, ulzerierende Colitis, Psoriasis und juvenile Arthritis) mit einer signifikanten Häufigkeit (z. B. über 1 Million) in den USA.

#### Patentansprüche

1. Arzneistoffträger, der feste Lipidpartikel beladen mit Ciclosporin oder Ciclosporinderivaten natürlichen und/oder synthetischen Ursprungs umfaßt.
2. Arzneistoffträger nach Anspruch 1, der tensidhaltige oder tensidfreie Partikel eines Lipids oder der Mischung von Lipiden umfaßt, die in einem Partikelgrößenbereich von 10 nm bis 100 µm liegen und bei Raumtemperatur fest sind, wobei die Partikel der Hautpopulation einen mittleren Teilchendurchmesser im Bereich von 40 nm bis 100 µm aufweisen und herstellbar sind, indem entweder eine innere Phase (Lipidphase) in einem Dispersionsmedium (Wasser, wäßrige Lösung oder eine mit Wasser mischbare Flüssigkeit) in geschmolzener oder erweichter Form dispergiert wird, oder eine innere Phase (Lipidphase) in einem Dispersionsmedium in einer festen Form dispergiert wird, wobei die feste Phase hierbei vor dem Dispergierprozeß fein zerkleinert wird.

3. Arzneistoffträger nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Partikel einen Teilchendurchmesser von 10 nm bis 10 µm aufweisen, durch Hochdruckhomogenisation hergestellt worden sind und in einem bei Raumtemperatur festem Zustand vorliegen, wobei die Partikel der Hauptpopulation einen mittleren PCS Teilchendurchmesser im Bereich von 40 nm bis 1000 nm besitzen.
- 5 4. Arzneistoffträger nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel der Hauptpopulation einen mittleren Teilchendurchmesser im Bereich zwischen 100 nm und 500 nm besitzen und daß mit geeigneten ausgewählten Prozeßparametern und Zusätzen die PCS Teilchendurchmesser im Bereich zwischen 40 nm und 100 nm liegen.
5. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, bei dem die Partikel durch Hochgeschwindigkeits-Rührung, Ultraschall-Beschallung oder einen Mahlprozeß, insbesondere durch Einsatz von Flüssigstrahl- (jet stream) oder Luftstrahlmühlen hergestellt worden sind und bei Raumtemperatur als feste Partikel vorliegen, wobei die Partikel der Hauptpopulation einen mittleren Teilchendurchmesser von 0,5 µm bis 100 µm (detektiert mittels Laserdiffraktometrie) aufweisen.
- 10 6. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt der inneren Phase (Lipidphase) bezogen auf die Gesamtformulierung im Bereich von 0,1% bis 40% (m/m) und insbesondere im Bereich zwischen 1% bis 20% (m/m) liegt.
- 15 7. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß er als Material der Partikelmatrix Monoglyceride, Diglyceride und/oder Triglyceride, Fettalkohole, deren Ester oder Ether, Wachse oder Lipidpeptide oder eine Mischung derselben aufweist.
8. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß er Glyceroltrilaurat, Glycerolmyristat, Glycerolpalmitat, Glycerolstearat und/oder Glycerolbehenat, oder eine Mischung derselben mit Mono-, Di- und Triglyceriden, als Glycerid-Mischung, insbesondere Imwitor 900, Fettalkohole, insbesondere Cetylalkohol und Stearylalkohol, und/oder Wachse, insbesondere Cetylpalmitat und gebleichtes Bienenwachs, beinhaltet.
- 20 9. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Zusatz von einem oder mehreren dispersionsstabilisierenden Zusätzen in einer Menge bezogen auf die Gesamtformulierung von 0,01% bis 30% (m/m) und insbesondere im Bereich von 0,5 bis 10% (m/m) aufweist.
- 25 10. Arzneistoffträger nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die dispersionsstabilisierenden Zusätze Substanzen aus der Reihe der Poloxamere, Poloxamine, ethoxylierten Monoglyceride und Diglyceride, ethoxylierten Lipide, ethoxylierten Fettalkohole und Alkylphenole, ethoxylierten Fettsäureester, Polyglycerinether und -ester, Lecithine, Ester und Ether von Zuckern oder Zuckeralkoholen mit Fettsäuren oder Fettalkoholen, Phospholipide und Sphingolipide, Sterole oder deren Ester und Ether, sowohl allein als auch in Form von deren Mischungen umfassen.
- 30 11. Arzneistoffträger nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die dispersionsstabilisierenden Substanzen Eilecithin, Soyalecithin oder hydrierte Lecithine, deren Mischungen oder der Mischung eines oder beider Lecithine mit einem oder mehreren Phospholipid-Komponenten, Cholesterol, Cholesterolpalmitat, Stigmasterin oder anderen Sterolen umfassen.
- 35 12. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Zusatz von ionischen Emulgatoren zur Ladungsstabilisierung bezogen auf die ursprüngliche Zubereitung in einer Menge von 0,01% bis 10% (m/m) und insbesondere im Bereich von 0,05–2% (m/m) umfaßt.
13. Arzneistoffträger nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er als geladene ionische Ladungsstabilisatoren Diacetatphosphat, Phosphatidylglycerol, gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, Natriumcholat, Natriumglycholat, Natriumtaurocholat oder deren Mischungen und/oder Aminosäuren umfaßt.
- 40 14. Arzneistoffträger nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er eine oder mehrere viskositäts erhöhende Substanzen bezogen auf die ursprüngliche Zubereitung in einer Menge von 0,1% bis 10% (m/m) und insbesondere innerhalb eines Bereichs von 0,5% bis 5% (m/m) umfaßt.
15. Arzneistoffträger nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er die viskositäts erhöhenden Stoffe Cellulose, deren Ether und Ester, Polyvinyl derivate, Alginate, Polyacrylate, Xanthane und/oder Pektine oder eine Mischung derselben umfaßt.
- 45 16. Arzneistoffträger nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß er außerdem einen oder mehrere Zucker und/oder einen oder mehrere Zuckeralkohole, insbesondere Glucose, Mannose, Trehalose, Mannitol und/oder Sorbitol umfaßt.
- 50 17. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß er (alleine oder in Kombination) Peptisatoren, insbesondere Natriumcitrat und/oder Natriumphosphate, umfaßt.
18. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel in destilliertem Wasser, in einer wäßrigen Lösung mit Zusätzen von Elektrolyten, Mono- und Disacchariden, Polyolen oder deren Mischungen oder in Flüssigkeiten, die mit Wasser mischbar sind, dispergiert sind, wobei als Additive Natriumchlorid, Mannose, Glucose, Fruktose, Xylose, Trehalose, Mannitol, Sorbitol, Xylitol und/oder Glycerol vorzugsweise in einer Menge von 0,1% bis 50% (m/m), und insbesondere im Bereich zwischen 1% und 30% (m/m) bezogen auf die ursprüngliche Zubereitung vorhanden sind.
- 55 19. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel lyophilisiert oder sprühetgetrocknet sind oder durch andere Trocknungsprozesse in eine trockene Form überführt oder verarbeitet wurden.
- 60 20. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Herstellung unter Ausschluß halogener organischer Lösungsmittel und bevorzugt unter Ausschluß von organischen Lösungsmitteln überhaupt erfolgt ist.
21. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß Ciclosporin in natürlicher oder synthetischer Form, alleine als aktive Substanz (Wirkstoff) oder in Mischung mit anderen aktiven Substanzen (Wirkstoffen) vorhanden ist.
- 65 22. Arzneistoffträger nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die aktive Substanz bzw. die aktiven Substanzen in den Partikeln fein dispergiert und/oder gelöst vorliegen und/oder auf der Oberfläche der Partikel adsor-

biert vorliegen.

23. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß 0,01% bis 70% Ciclosporin, vorzugsweise 1% bis 30% Ciclosporin, kalkuliert auf das Gewicht der Partikel (d. h. Lipid + Ciclosporin = 100%), vorhanden sind.

24. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß er aus einer Mischung von Mono-, Di- und Triglyceriden der Palmitin- und Stearinsäure als Lipidmatrix, die mit 0,01% bis 70%, vorzugsweise 5% bis 30% Ciclosporin beladen ist und mit einer Mischung von Polyoxyethylenglycerolmonostearat und Natriumchololat stabilisiert, besteht.

25. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß er aus einer Mischung von Mono-, Di- und Triglyceriden der Palmitin- und Stearinsäure als Lipidmatrix, die mit 5% bis 30% Ciclosporin beladen ist und mit Lecithinen, Poloxamer 188, einem Zuckeralkohol oder -ester oder -ether, Polysorbat 20, 40, 60 oder 80, Natriumchololat oder deren Mischungen stabilisiert ist, besteht.

26. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß er in Form einer Endformulierung zur oralen und peroralen Anwendung als trockenes Pulver in Sachets zur Rekonstitution als Suspension vor dem Gebrauch, als Pellets, Granulat, Tablette, Brausetablette, Kapsel und therapeutisches Arzneistofffreisetzungssystem, insbesondere als bioadhäsive Tablette vorliegt.

27. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß er in Form einer Endformulierung zur parenteralen Anwendung, insbesondere als Partikelsuspension oder zu größeren Freisetzungseinheiten verarbeitet, wie vorzugsweise Tabletten oder Zylindern zur Implantation vorliegt.

28. Arzneistoffträger nach einem der Ansprüche 1 bis 27 für die therapeutische Behandlung mit Ciclosporin-Formulierungen, die eine mittlere Blutspiegelkonzentration im Steady State Bereich von 300 ng/ml bis über 1000 ng/ml, vorzugsweise über 800 ng/ml, insbesondere bis 900 ng/ml, bevorzugt von 400 ng/ml bis 800 ng/ml unter Abwesenheit hoher mittlerer initialer Blutspiegelkonzentrationen über 1200 ng/ml, vorzugsweise über 1000 ng/ml und bevorzugter über 800 ng/ml erzeugt.

29. Arzneistoffträger nach Anspruch 28, der die mittlere Blutspiegelkonzentration im Steady State Bereich für einen verlängerten Zeitraum von mindestens 5 h, vorzugsweise mindestens 7 h, insbesondere 9 h erzeugt.

30. Therapeutische Behandlung mit Ciclosporin Formulierungen, die eine mittlere Blutspiegelkonzentration im Steady State Bereich von 300 ng/ml bis über 1000 ng/ml, vorzugsweise über 800 ng/ml, insbesondere bis 900 ng/ml, bevorzugt von 400 ng/ml bis 800 ng/ml unter Abwesenheit hoher mittlerer initialer Blutspiegelkonzentrationen über 1200 ng/ml, vorzugsweise über 1000 ng/ml und bevorzugter über 800 ng/ml erzeugt.

31. Therapeutische Behandlung nach Anspruch 30, die eine verlängerte mittlere Blutspiegelkonzentration im Steady State Bereich für einen verlängerten Zeitraum von mindestens 5 h, vorzugsweise mindestens 7 h, insbesondere 9 h erzeugt.

---

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

---

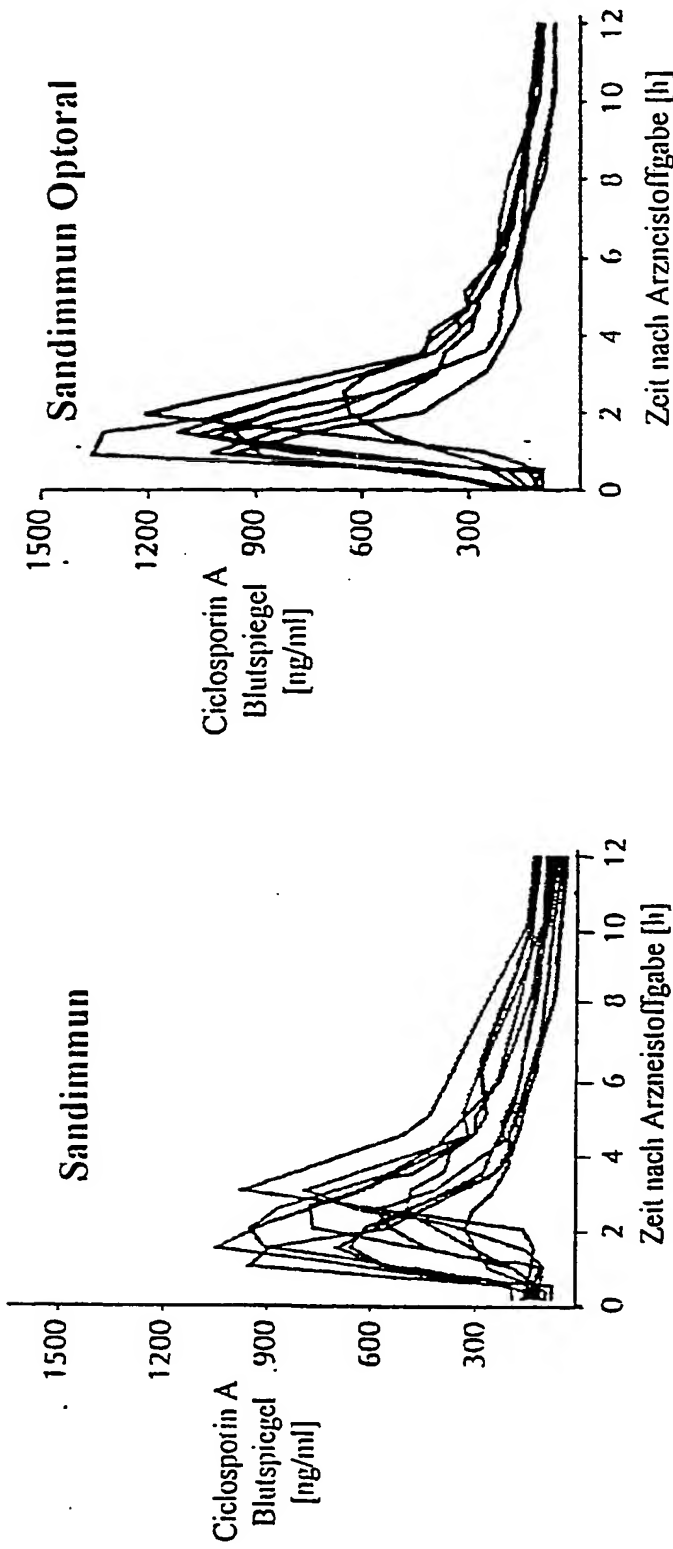


Abb. 1

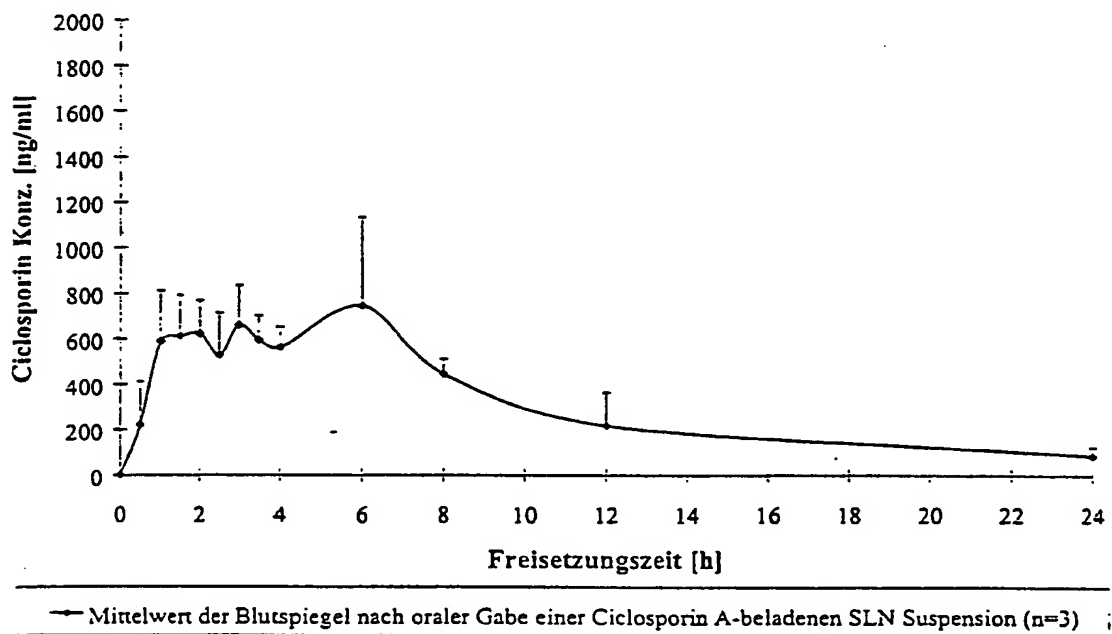
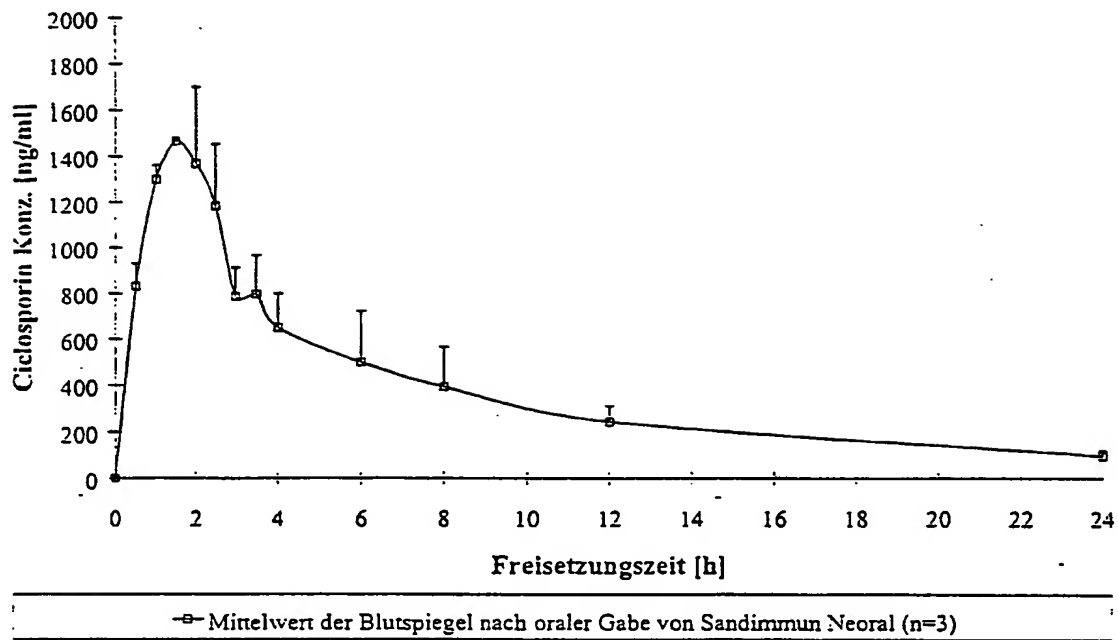
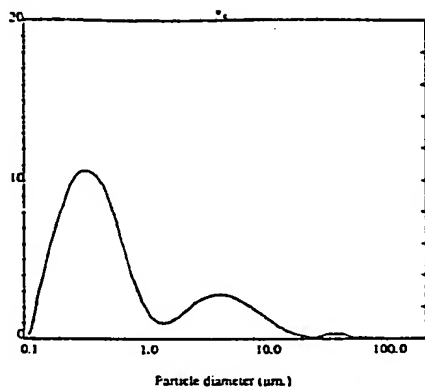
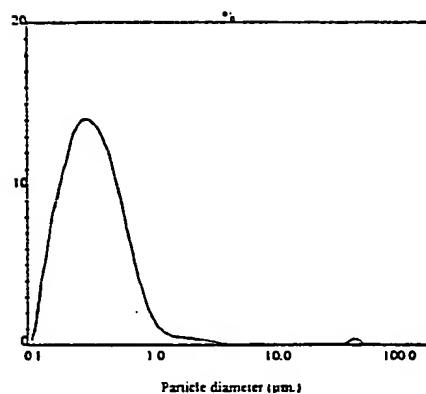


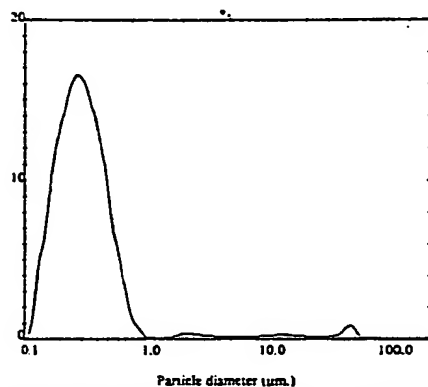
Abb. 2



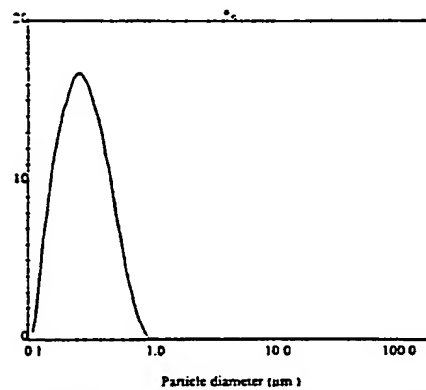
1. Homogenisationszyklus einer arzneistofffreien SLN Suspension



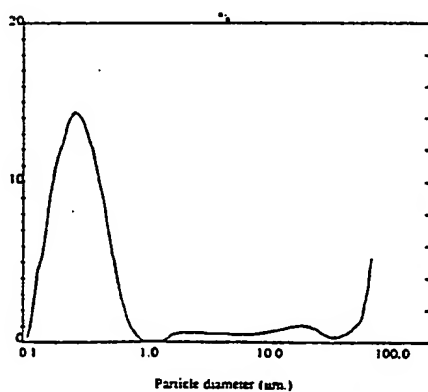
1. Homogenisationszyklus einer 2% Cyclosporin A-beladenen SLN Suspension



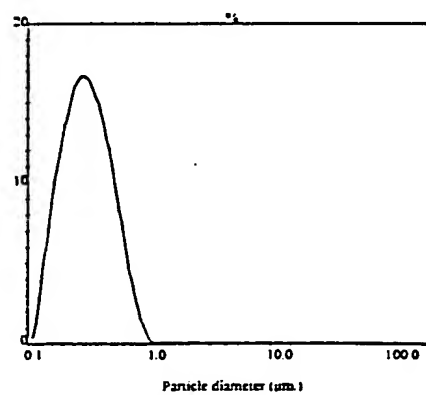
3. Homogenisationszyklus einer arzneistofffreien SLN Suspension



3. Homogenisationszyklus einer 2% Cyclosporin A-beladenen SLN Suspension



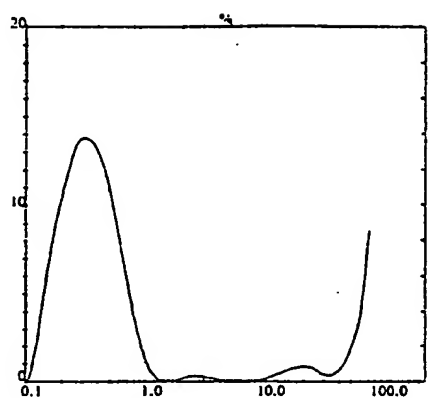
5. Homogenisationszyklus einer arzneistofffreien SLN Suspension



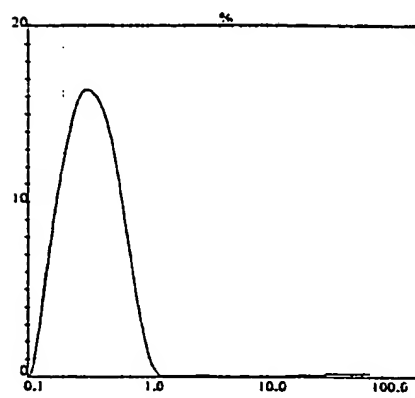
5. Homogenisationszyklus einer 2% Cyclosporin A-beladenen SLN Suspension

Abb. 3

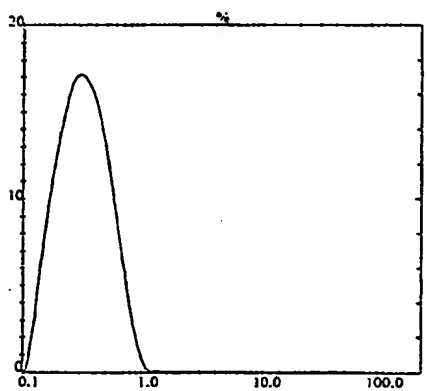




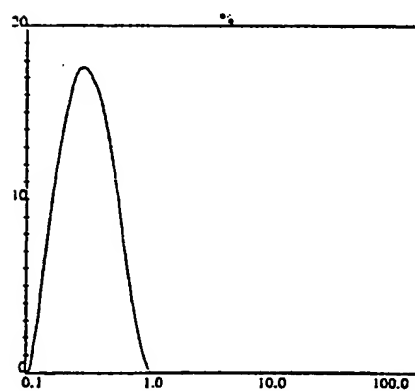
5% Cyclosporin A-beladene SLN Suspension  
hergestellt bei 85 °C



10% Cyclosporin A-beladene SLN Suspension  
hergestellt bei 85 °C

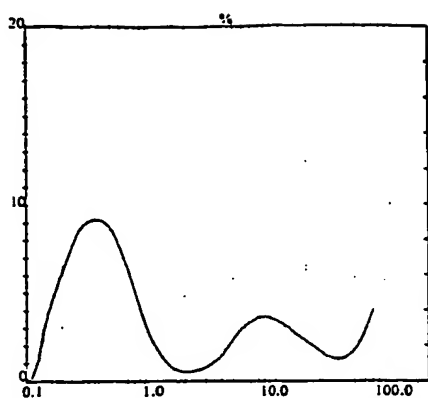


15% Cyclosporin A-beladene SLN Suspension  
hergestellt bei 85 °C

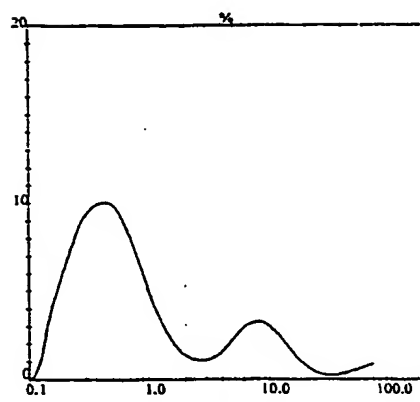


20% Cyclosporin A-beladene SLN Suspension  
hergestellt bei 85 °C

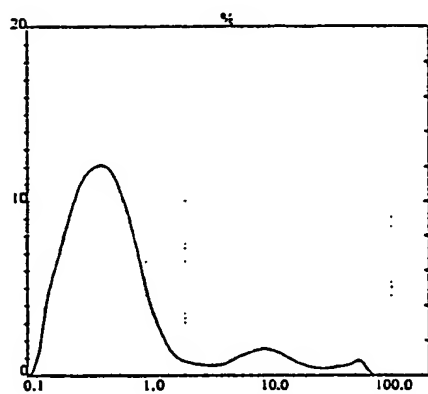
Abb. 4a



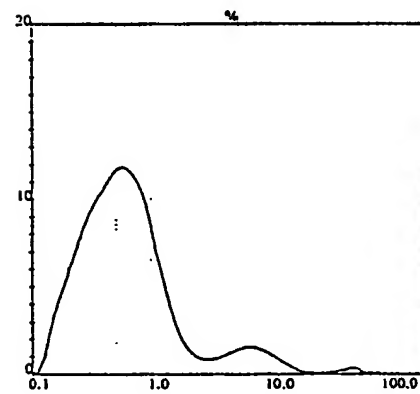
5% Cyclosporin A-beladene SLN Suspension  
hergestellt bei 55 °C



10% Cyclosporin A-beladene SLN Suspension  
hergestellt bei 55 °C



15% Cyclosporin A-beladene SLN Suspension  
hergestellt bei 55 °C



20% Cyclosporin A-beladene SLN Suspension  
hergestellt bei 55 °C

Abb. 4b

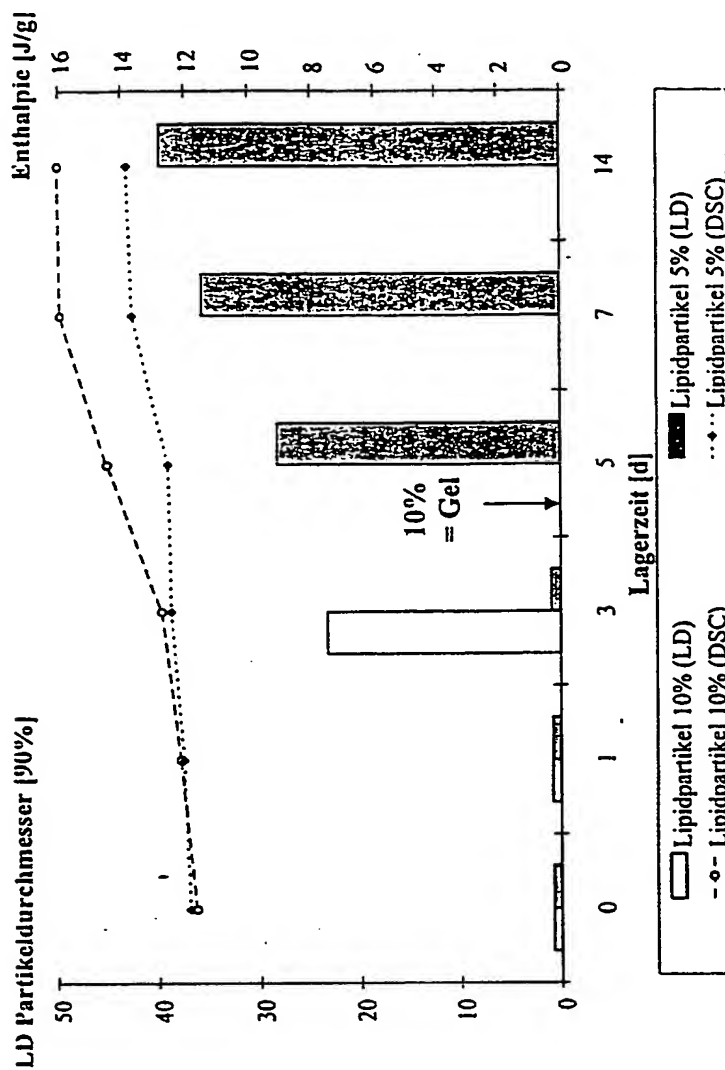


Abb. 5

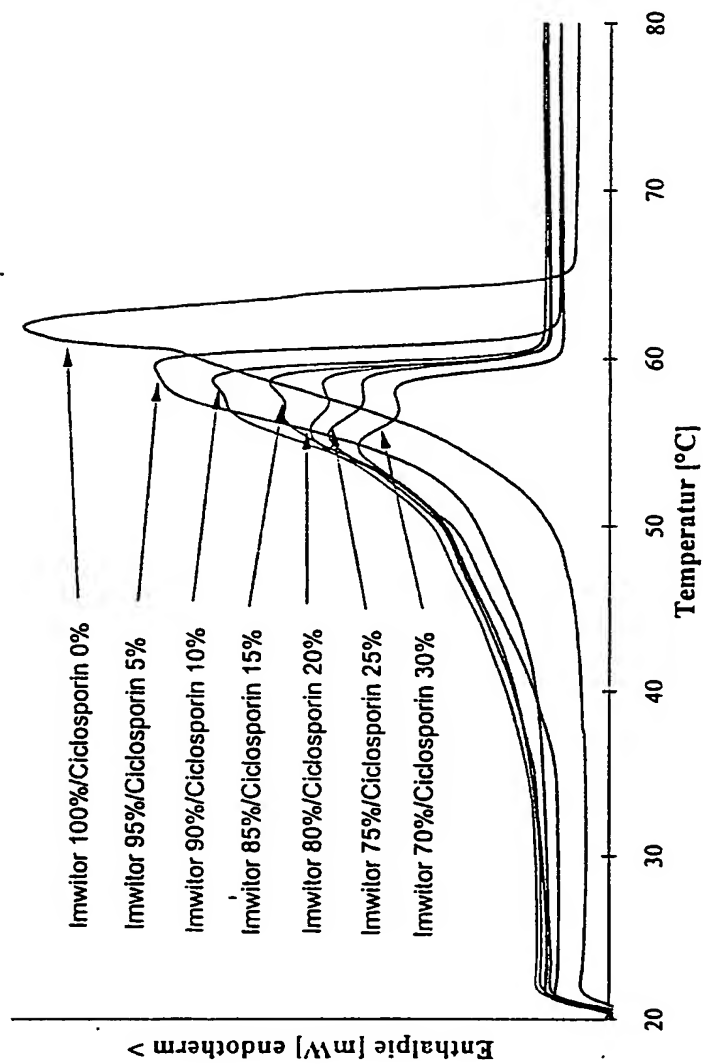


Abb. 6

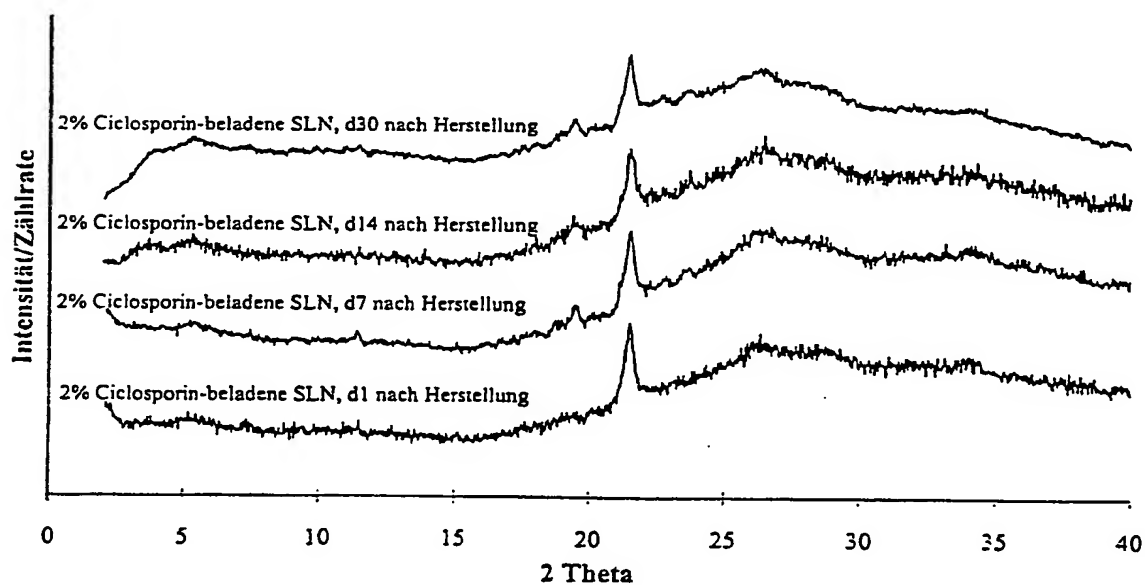
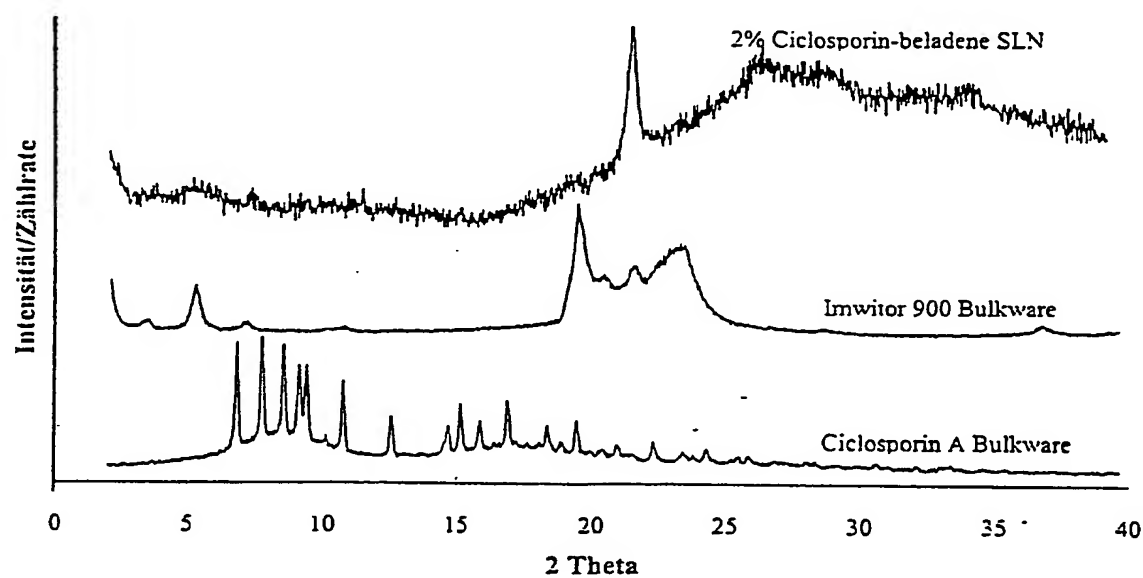


Abb. 7

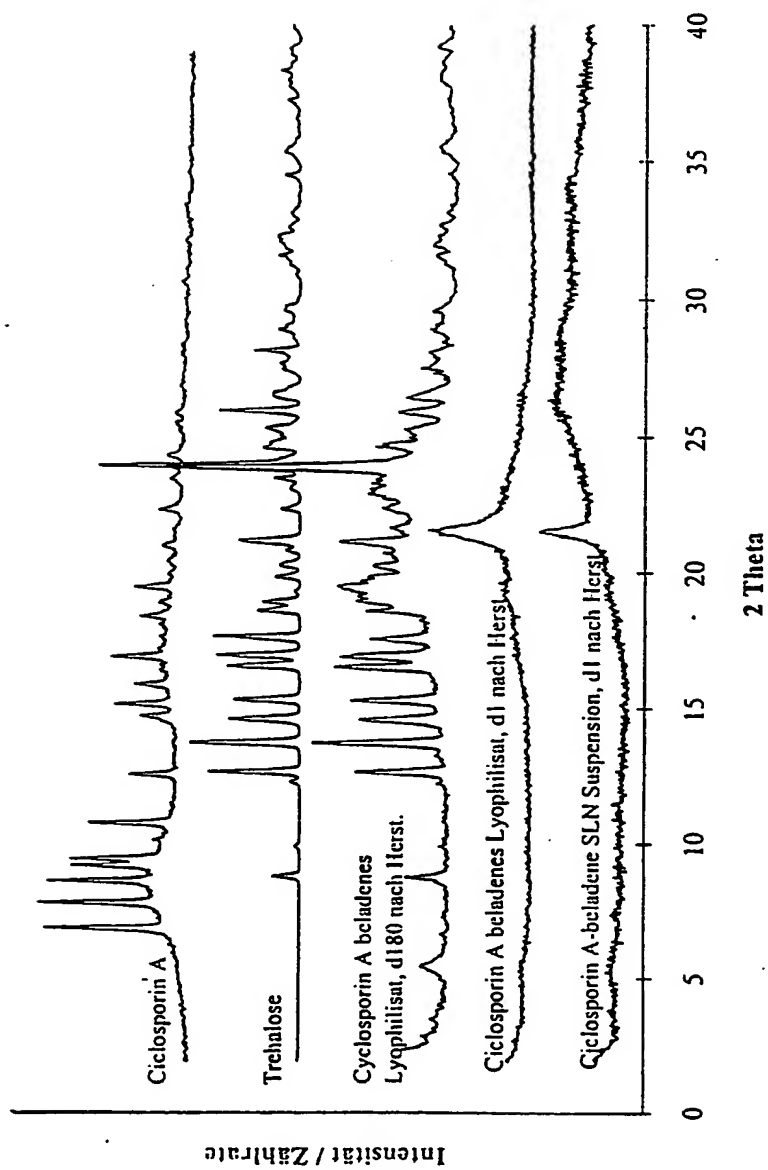


Abb. 8